

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. med. H. Kewitz

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINBAU VON
 ^3H -CHOLIN IN CHOLINHALTIGE VERBINDUNGEN
DES SKELETT-MUSKELS DER RATTE UND
SEINE BEEINFLUSSUNG DURCH DENERVIERUNG**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Udo Stember
Wilhelmshaven

1983



Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. H. Kewitz

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINBAU VON ^3H -CHOLIN
IN CHOLINHALTIGE VERBINDUNGEN DES SKELETT-
MUSKELS DER RATTE UND SEINE BEEINFLUSSUNG
DURCH DENERVIERUNG

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Udo Stemmer
Wilhelmshaven

Referent: Prof. Dr. med. H. Kewitz

Korreferent: Prof. Dr. F. von Bruchhausen

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 21. 1. 1983

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I EINLEITUNG	5
II MATERIAL UND METHODEN	18
1 Tiere	18
2 Chemikalien	18
3 Radioaktive Substanzen	18
4 Vorbehandlung der Tiere	19
5 Versuchsablauf	19
6 Aufarbeitung von Blut und Muskelgewebe zur Extraktion der cholinhaltigen Verbindungen	19
7 Aufarbeitung der Lipidphase	21
7.1 Isolierung des Lezithins	21
7.2 Messung der Radioaktivität	21
7.3 Bestimmung der Lezithinkonzentration	22
8 Aufarbeitung der Wasserphase	22
8.1 Papierchromatographie	22
8.2 Hydrolyse des PC und CDP-Cholins	24
8.3 Ionenpaarextraktion	24
8.4 Messung der Radioaktivität	24
8.5 Bestimmung der Cholinkonzentration	25
9 Wiederfindung der Radioaktivität	25
10 Berechnung der Umsatzgeschwindigkeiten	26
11 Statistische Auswertung	28

	Seite
III	ERGEBNISSE 29
1	Die Konzentrationen im Blut und in der Skelettmuskulatur und deren Beeinflussung durch Denervierung 29
1.1	Die Konzentration von Cholin im Blut 29
1.2	Die Konzentrationen von Ch, PC, CDP-Ch, Lez und GPC im Skelettmuskel 29
2	Der Einbau von ^3H -Cholin in cholinhaltige Verbindungen des Skelettmuskels 31
2.1	Unbehandelte Tiere 31
2.2	Vorbehandelte, d. h., 24 h vorher auf der rechten Seite denervierte Tiere 37
3	Einfluß von Operation und Äthernarkose auf den Einbau von ^3H -Cholin 53
IV	DISKUSSION 56
1	Einfluß von Äthernarkose und Muskelschnitt 56
2	Nicht operierte Tiere 56
2.1	Konzentration 56
2.2	Spezifische Aktivität 57
3	Operierte Tiere 59
V	ZUSAMMENFASSUNG 65
VI	LITERATURVERZEICHNIS 68

I EINLEITUNG

Das im Körper vorhandene Cholin ist zum kleineren Teil Bestandteil des Neurotransmitters Acetylcholin, zum weitaus größten Teil aber in den Phospholipiden Lezithin, Sphingomyelin, Lysolezithin und Plasmalogen sowie ihren Vorstufen und Abbauprodukten enthalten.

In den Phospholipidmolekülen stehen sich apolare und polare Gruppen gegenüber. Daher können sie zwischen Wasser und Lipid monomolekulare Grenzschichten bilden. Darauf beruht das Strukturprinzip vieler biologischer Membranen. Im tierischen Organismus überwiegen mengenmäßig die Lezithine (50 %), gefolgt von den Phosphatidyläthanolaminen (22 %), den Plasmalogenen (10 %) und den Phosphatidylinositolen (9 %). Sphingomyeline, Phosphatidylserine und Lysolezithine sind in kleineren Mengen vorhanden. (Angaben für den Skelettmuskel der Ratte; Plasmalogen für den Skelettmuskel des Affen), (45, 61, 72).

Die chemische Struktur von Lezithin ist in Abb. 1 dargestellt. 1 Mol Glycerin ist mit 2 Mol Fettsäure und 1 Mol Phosphorylcholin verestert. Stehen Äthanolamin oder Serin an der Stelle des Cholins, werden die Verbindungen Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin genannt.

Aufbau und Abbau von Lezithin im Säugetierorganismus

a) Synthesewege des Lezithins

1. KENNEDY und WEISS (35) konnten in vitro zeigen, daß Cholin über mehrere Zwischenprodukte ins Lezithin eingebaut wird (Abb. 2). Aus Cholin und



ATP entsteht unter der Einwirkung von Cholin-kinase Phosphorylcholin (PC). Als nächster Schritt erfolgt die Aktivierung des PC mit Cytidintriphosphat zu Cytidindiphosphatcholin (CDP-Ch), katalysiert von der Phosphorylcholin-Cytidyltransferase.

Mittels der CDP-Cholin-1,2-Diacylglycerid-Cholinphosphotransferase wird der Phosphorylcholinanteil auf ein Diacylglycerid übertragen. Dadurch entsteht Lezithin. Die beiden letzten Schritte können bei hohem Überschuß an Produkt auch umgekehrt verlaufen (35, 71).

BJØRNSTEDT und BREMER (5) zeigten, daß die von KENNEDY und WEISS beschriebenen Reaktionen auch in vivo ablaufen. PENNINGTON (53) wies nach, daß dies auch der Weg ist, auf dem Lezithin im Skelettmuskel gebildet wird.

2. Lezithin kann auch durch schrittweise N-Methylierung von Phosphatidyläthanolamin entstehen. Methylgruppendonator ist hierbei S-Adenosylmethionin. Quantitativ spielt dieser Weg der Lezithinsynthese nur in der Leber eine Rolle (2, 5, 7, 18), (Abb.3).
3. Ein weiterer Syntheseweg zum Lezithin ist die Acylierung von Lysolezithin mit Hilfe von Acyl-CoA. Dabei wird die Fettsäure des acylierten CoA auf Lysolezithin übertragen (32, 41). Bei der Bildung von Lezithin aus 2 Lysolezithinmolekülen wird die Fettsäure des einen Lysolezithinmoleküls auf das andere übertragen (14), (Abb. 4).

4. DILS und HÜBSCHER (12) wiesen auf einen Calcium-stimulierbaren Basenaustausch zwischen freien Basen und den in den Phospholipiden gebundenen hin. So kann freies Cholin gegen gebundenes Serin oder Äthanolamin ausgetauscht werden, so daß aus Phosphatidylserin oder Phosphatidyläthanolamin Lezithin entstehen kann (4, 68), (Abb. 5).

SALERNO und BEELER(58) haben jedoch gezeigt, daß Cholin in erster Linie über den "Kennedy-Weg" ins Lezithin eingebaut wird und andere Wege quantitativ weniger in Erscheinung treten.

b) Abbauwege des Lezithins

Am Abbau des Lezithins sind verschiedene Phospholipasen beteiligt. Phospholipase A1 oder A2 katalysieren die Abspaltung einer der beiden Fettsäuren, entweder die an C1 oder die an C2 des Glycerinrestes. Phospholipase B1 oder B2 spalten aus dem verbliebenen Lysolezithin die Fettsäure ab, so daß Glycerophosphorylcholin (GPC) entsteht (9). Dieses wird durch die GPC-Diesterase in Cholin und Glycerophosphat gespalten (10), (Abb. 6).

Die bereits erwähnte Rückreaktion zu CDP-Cholin und der Basenaustausch stellen ebenfalls Abbauwege dar, von denen in der Muskulatur der Basenaustausch eine gewisse Rolle spielen könnte.

Zwischen der Plasmamembran, intrazellulären Membranen und einem intrazellulären Pool findet ein ständiger Austausch von intakten Phospholipiden statt (34, 63), vermutlich mit einem Protein als Carrier (47). WIRTZ berichtete, daß 30 % der Phospholipide in 90 Minuten ausgetauscht werden (74).

Phospholipidmoleküle können aber auch partiell erneuert werden, indem bestimmte Molekülkomponenten ausgetauscht werden, z. B. die Basen, während der Rest des Moleküls unverändert bleibt (67).

Die Erregungsübertragung zwischen Nerv und Muskel erfolgt an den motorischen Endplatten durch den Transmitter Acetylcholin. Als Speicher für Acetylcholin dienen synaptische Vesikel in der terminalen Axonverzweigung.

Die synaptische Erregungsübertragung erfolgt durch Exocytose des in den Bläschen gespeicherten Acetylcholins in den synaptischen Spalt. Dabei vereinigen sich die Membranen der synaptischen Bläschen mit der Plasmamembran der Nervenendigung und Acetylcholin wird nach außen entleert. Durch den Einbau von Vesikeln in die Außenmembran der Nervenendigung wird deren Oberfläche vergrößert. Andererseits werden durch Abschnüren von der Membran der Nervenendigung neue Vesikel gebildet. Als Übergangsstadium finden sich an der Membran sogenannte Zysternen, deren Inhalt in die Nervenendigung aufgenommen wird. Die neugebildeten Vesikel speichern wiederum Acetylcholin, das dann erneut für die Erregungsübertragung zur Verfügung steht (8, 23, 24), (Abb. 8).

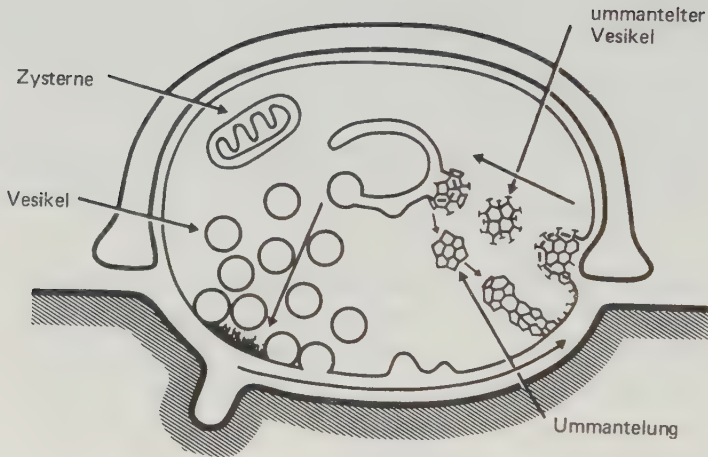


Abb. 8

Schematische Darstellung des Recyclings von synaptischen Vesikeln
(nach Heuser und Reese, 23).

Der Umsatz einer Vesikelpopulation in einer neuromuskulären Nervenendigung dauert in Ruhe etwa 3 Stunden und unter Stimulation nur 10 bis 30 Minuten (8, 54).

Während der Stimulation werden etwa 7 % des gesamten in den Vesikeln vorhandenen Acetylcholins freigesetzt. In Ruhe werden dagegen nur 0,5 % pro Minute freigesetzt (54).

Untersuchungen am denervierten Muskel reichen bis ins vorige Jahrhundert zurück (57). GRUND (21) beschrieb 1912 die Abnahme des Phospholipidgehaltes im Skelettmuskel nach Denervierung.

Mit der Einführung von radioaktiven Isotopen in biochemische Untersuchungen gewann man erste Einblicke in den Metabolismus der Phospholipide. 1940 erschienen die ersten Arbeiten über den Einfluß der Denervierung auf den Einbau von markiertem Phosphat in die Phospholipide des Muskels (1, 17). Weitere Kenntnisse über den Phospholipidstoffwechsel erhielt man, als anstelle von markiertem Phosphat auch markiertes Cholin verwendet wurde. Auf diese Weise wurde der Einbau von ^{14}C -Cholin ins Lecithin des Skelettmuskels (53), des Diaphragmas (46) und von verschiedenen Organen (Gehirn (37), Leber, Lunge, Herz, Niere, Dünndarm (5)) untersucht. Genauere Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Funktion des Skelettmuskels und dem Umsatz des Cholins fehlen jedoch.

KRAUPP (39) konnte zeigen, daß der denervierte Muskel vermehrt Cholin an das Blut abgibt und daß der innervierte Muskel unter elektrischer Stimulation weniger Cholin abgibt als unter Ruhebedingungen.

Fragestellung der Arbeit

Die Abgabe von Acetylcholin aus der Nervenendigung in den synaptischen Spalt durch Exocytose sollte mit einer erhöhten Umsatzrate von Membranbestandteilen verknüpft sein, denn die präsynaptische Membran muß dabei zunächst geöffnet werden, dann mit Membranen synaptischer Vesikel

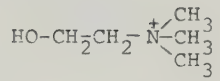
verschmelzen und schließlich muß die Membran wieder verschlossen werden. Bildung und Abbau sollten während der Erregungsübertragung beschleunigt sein und nach Denervierung des Muskels sollte dieser Anteil des Membranstoffwechsels völlig sistieren.

Hypothese: Bei völliger Unterbrechung der Erregungsübertragung sollte an den motorischen Endplatten

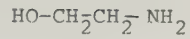
1. ein schneller Anteil des Lipidstoffwechsels sistieren,
2. das Lipid um diesen Anteil abfallen,
3. das Cholin ansteigen, da es nicht verbraucht wird.

Als Indikator, mit dessen Hilfe die Hypothese geprüft werden kann, dient der Umsatz des Lezithins, eines der Hauptbestandteile der Membran. Zu prüfen ist, ob im denervierten Muskel weniger Lezithin umgesetzt wird als im innervierten. Dazu müssen im denervierten und im kontralateralen innervierten Muskel die Konzentrationen von Lezithin sowie seiner Vorstufen und Abbauprodukte bestimmt werden. Durch Ermittlung der Einbauraten von markiertem Cholin über die verschiedenen Vorstufen bis ins Lezithin sollte es möglich sein, die Umsatzgeschwindigkeiten der einzelnen Reaktionsschritte zu errechnen und daraus zu schließen, in welcher Phase und in welchem Ausmaß der Lezithin-stoffwechsel verändert ist.

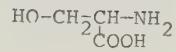
Cholin



Äthanolamin



Serin



Lezithin

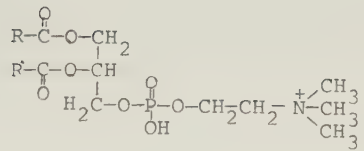


Abb. 1: Chemische Struktur der in den Phospholipiden vorkommenden Basen Cholin, Äthanolamin und Serin und von Lezithin.

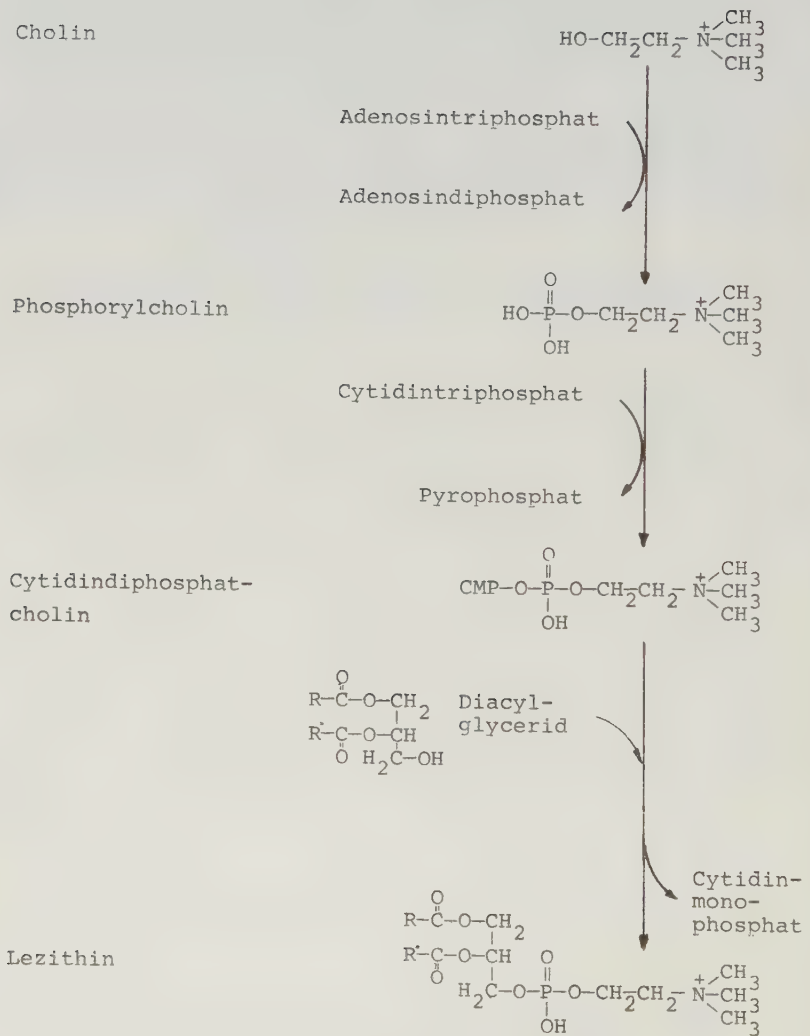


Abb. 2: Syntheseweg des Lezithins nach Kennedy und Weiss (35) .

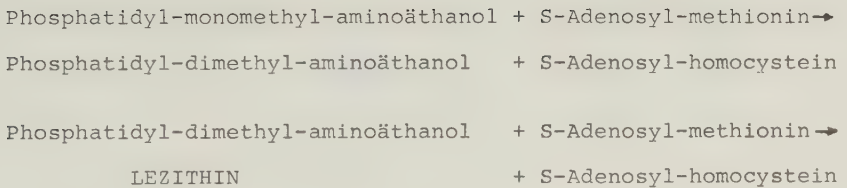
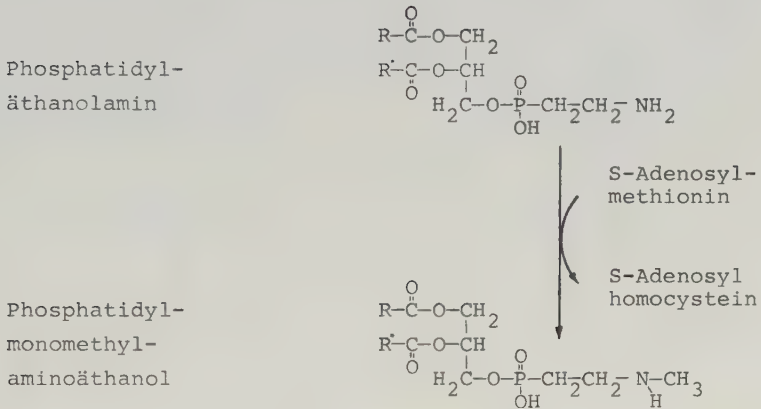
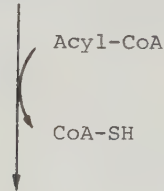
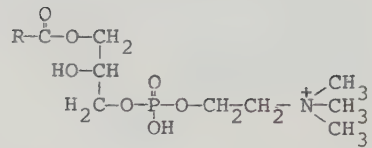


Abb. 3: Lezithinsynthese durch schrittweise N-Methylierung
 von Phosphatidyläthanolamin (2,5,7,18).

a)

Lysolezithin



LEZITHIN

b)

Lysolezithin + Lysolezithin $\longrightarrow$

LEZITHIN + Glycerophosphorylcholin

Glycerophosphorylcholin

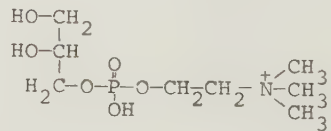


Abb. 4: Lezithinsynthese durch a) Acylierung von Lysolezithin und b) aus 2 Lysolezithinmolekülen durch Übertragung einer Fettsäure (14,32,41).

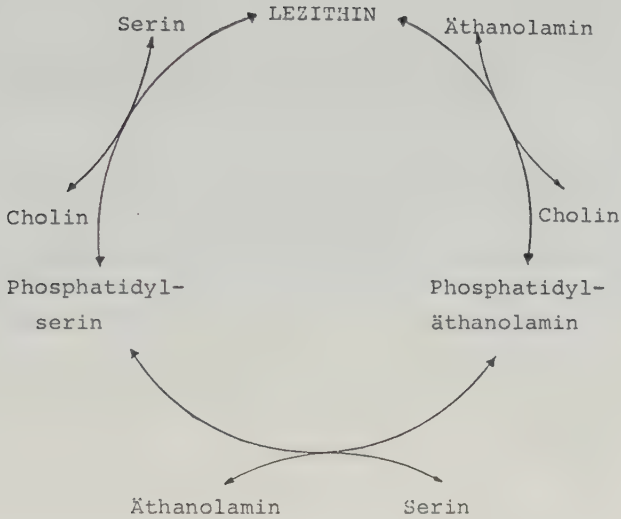


Abb. 5: Lezithinsynthese durch Basenaustausch von Cholin, Äthanolamin und Serin (4, 12, 68) nach Bjerve (4).

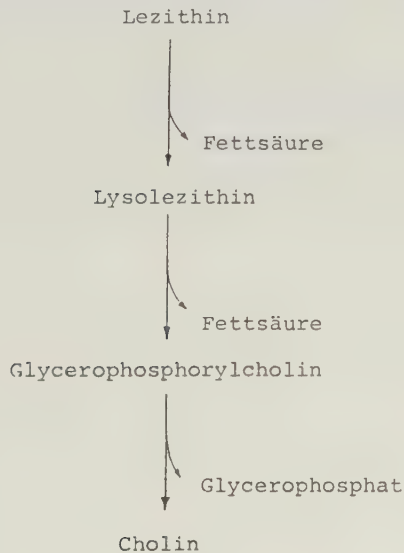


Abb. 6: Abbauweg des Lezithins nach Dawson (9, 10).

II MATERIAL UND METHODEN

1. Tiere

Für die Versuche wurden 120 - 160 g schwere männliche von der Fa. Mus-Rattus bezogene Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Tiere stammten aus einer SPF-Zucht (specific-pathogen-free), d. h., sie waren frei von krankheitserregenden Mikroorganismen. Sie wurden mit Fertigfutter der Fa. Altromin GmbH ernährt und erhielten Leitungswasser.

2. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden aus dem Handel bezogen. Sie trugen die Qualitätsbezeichnung "reinst" oder wo erhältlich "pro analysi".

3. Radioaktive Substanzen

[Methyl-³H]-Cholinchlorid mit einer spezifischen Aktivität von 69,5 Ci/mmol wurde von der Fa. NEN Boston, Mass., USA bezogen.

Zur Injektion wurden 6,9 mCi in 20 ml 0,9 % Kochsalzlösung gelöst und pro 100 g Körpergewicht 0,2 ml dieser Lösung in die Schwanzvene injiziert.

4. Vorbehandlung der Tiere

Bei einem Teil der Tiere wurde 24 Stunden vor dem Versuch der rechte Nervus ischiadicus durchtrennt. Der 24 Std.-Zeitraum wurde gewählt, weil nach dieser Zeit noch keine Veränderungen an der Muskelfasermembran stattfinden (52), während die ersten strukturellen Veränderungen an der motorischen Endplatte schon zu beobachten sind (55). Die Operation erfolgte in Äthernarkose. Nach Haut- und Muskelschnitt von ca. 4 mm Länge medial des Trochanter major wurde der Nerv freigelegt und ein ca. 1,5 mm langes Stück herausgeschnitten. Danach wurden Muskel- und Hautschnitt mit Wundklammern verschlossen. Die Operation dauerte ungefähr 7 Minuten, die Narkose 10 - 12 Minuten.

5. Versuchsablauf

24 Stunden nach der Denervierung wurde den Tieren die unter 3. angegebene Dosis von radioaktiv markiertem Cholin gespritzt. Hierbei handelt es sich um eine Tracerdosis, durch die die Cholinkonzentration des Blutes nur unwesentlich und sehr kurz dauernd (ca. 1 Min) erhöht wird. Nach dieser Injektion wurden die Tiere in Zeitintervallen von 2 min bis 30 min durch Dekapitieren getötet.

6. Aufarbeitung von Blut und Muskelgewebe zur Extraktion der cholinhaltigen Verbindungen (5)

Das Blut wurde in 96 %igem Äthanol aufgefangen, 10 min geschüttelt und mit 3000 U/min 10 min zentrifugiert. Vom Überstand wurde ein Aliquot von 8 ml entnommen und bei 50°C im Wasserbad eingeeengt.

Nach dem Ausbluten wurde der Musculus gastrocnemius auf beiden Seiten freipräpariert, entnommen, von sichtbarem Fett, Nerven und Sehnenansätzen befreit und mit dem Skalpell fein zerkleinert. Nach dem Wiegen - das Gewicht eines M. gastrocnemius lag bei 0,7 bis 1 g - wurde der Muskel in 20 ml 66 %igem Äthanol 30 s mit dem Ultra-Turrax homogenisiert, 10 min geschüttelt und mit 3000 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und bei 50°C im Wasserbad eingeeengt. Dem Rückstand wurden 20 ml 96 %iger Äthanol zugefügt, homogenisiert, geschüttelt und zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde zum ersten gegeben und ebenfalls eingeeengt; der Rückstand wurde verworfen.

Vom Dekapitieren bis zum Homogenisieren des Muskelgewebes vergingen etwa 3 Minuten.

Der eingeeengte Überstand der Muskelgewebsproben wurde mit 2 ml H_2O aufgenommen, mit 20 ml Heptan/Amylalkohol (2:1 V/V) 5 min ausgeschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (13). Die lipophile obere Phase wurde abpipetiert und gesammelt. Dieser Vorgang wurde 2 x mit Heptan/Amylalkohol und 2 x mit Diäthyläther durchgeführt. Die lipophile Phase und die verbliebene wässrige Phase wurden getrennt bei 50°C im Wasserbad eingeeengt.

Der eingeeengte Überstand des Blutes wurde genauso extrahiert, nur betrug hier die Zugabe von Heptan/Amylalkohol bzw. Diäthyläther nur je 8 ml und die obere lipophile Phase wurde abgesaugt und verworfen, da im Blut nur das wasserlösliche Cholin bestimmt wurde.

7 Aufarbeitung der Lipidphase

7.1 Isolierung des Lezithins

Die Trennung des Lezithins von den anderen lipidlöslichen Verbindungen des Muskels erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (66).

Dazu wurde die eingeengte Lipidphase in 5 ml 96 %igem Äthanol aufgenommen und

- a) 250 µl zur Messung der Radioaktivität des Lezithins und
- b) 50 µl zur Bestimmung der Lezithinkonzentration

auf Kieselgelplatten G 60 der Fa. Merck aufgetragen. Die Platten wurden in einer Trennkammer aufsteigend entwickelt. Als Fließmittel diente ein Gemisch von Chloroform-Methanol-H₂O (65:25:3, v/v/v). Zur Anfärbung der getrennten Verbindungen wurden die getrockneten Platten in einer Kammer mit Joddämpfen behandelt. Jod lagert sich reversibel an Cholin an, so daß an der braunen Farbe die Lokalisation des Cholins auf dem Chromatogramm erfolgen konnte. Die Identifizierung der markierten Areale erfolgte mit Hilfe eines Leitchromatogramms. Nach Verdunstung des Jods wurde das Lezithinareal ausgekratzt und gesammelt.

7.2 Messung der Radioaktivität

Zur Messung der Radioaktivität im Lezithin wurde das Kieselgel ohne vorhergehende Elution mit 10 ml gebrauchsfertigem Instagel-Szintillator der Fa. Packard aufgenommen und 2 ml H₂O zugefügt (64). Die Impulse wurden in einem Packard Tricarb Flüssigkeitsszintillationszähler Modell 2650 gemessen.

Die Standardabweichung war $\leq 2,5 \%$.

7.3 Bestimmung der Lezithinkonzentration

Die Bestimmung der Lezithinkonzentration erfolgte durch Messung des Phosphatanteiles des Lezithins (51). Das Kieselgel aus dem 50 µl-Auftrag wurde in Röhrchen gesammelt, die durch Reinigung mit Chromschwefelsäure phosphatfrei waren. Als Leerwert diente reines Kieselgel, das etwa der Menge des Lezithinareals entsprach. Als Standard wurden 0,5 ml (≈ 2 µg-Phosphat) einer Phosphatlösung (32,8 mg Phenylphosphat-Dinatrium in 1000 ml H₂O, W/V) verwendet. Alle Röhrchen wurden zum Aufschluß des Lezithins mit 0,7 ml 70 %iger Perchlorsäure versehen und danach für 30 Min. in einen auf 180°C geheizten Aluminiumblock gestellt. Danach lag der Phosphatanteil des Lezithins in anorganischer Form vor. Zu den abgekühlten Proben wurden 4,6 ml 0,22 %ige Ammoniummolybdatlösung (2,2 g Ammoniumheptamolybdat in 1000 ml H₂O W/V) und 0,2 ml Fiske-Subbarow-Lösung (15) gegeben und für weitere 10 Min. in einem Heizblock bei 100°C inkubiert. Phosphor bildet mit Molybdat in saurer Lösung einen Phosphormolybdatkomplex, der durch Fiske-Subbarow-Lösung zu Molybdänblau reduziert wird. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die Extinktion im Zeiss Photometer bei 830 nm gemessen. Mit Hilfe der spezifischen Extinktion wurde die Phosphatkonzentration berechnet.

8 Aufarbeitung der Wasserphase

8.1 Papierchromatographie (36)

Zur Reinigung der eingeengten wässrigen Phase wurde diese in 5 ml 66 %igem Methanol aufgenommen. Davon wurde ein Aliquot zur weiteren Verwendung entnommen und eingeengt.

Die Papierchromatographie erfolgte absteigend auf Papier der Fa. Schleicher u. Schüll Nr. 2043 mgI X mit zwei Läufen, die nacheinander mit zwei verschiedenen Fließmitteln durchgeführt wurde.

1. n-Propanol/0,2 m Ammoniumacetat (4:1, V/V) über 42 h.
2. n-Butanol/n-Propanol/98 %iger Äthanol/Ameisensäure /H₂O (6:2:1:1:2, V/V) über 20 h.

Zur Lokalisation der zu trennenden Substanzen wurde an den Seiten eines jeden Bogens Ch, PC und GPC als Reinstoff aufgetragen. Diese Substanzen wurden nach der Chromatographie mit Dragendorffs Reagenz angefärbt. Die Bahnen der zu trennenden Substanzen wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Cholin ließ sich so von den anderen Verbindungen trennen. Das Cholin wurde 12 h mit Wasser aus dem Papier eluiert und anschließend bei 50°C im Wasserbad eingengt.

PC und GPC ließen sich papierchromatographisch nicht einwandfrei trennen und wurden deshalb gemeinsam mit 1 n HCl über 12 h eluiert. Das Eluat wurde dann 15 Min. im kochenden Wasserbad inkubiert. Bei 100°C wird GPC vollständig in Cholin und Glycero-P hydrolysiert, während PC nicht gespalten wird (13). Bei der anschließenden Rechromatographie wurde der Ch-Anteil des GPC vom PC getrennt. Beide Verbindungen wurden 12 h mit Wasser eluiert und im Wasserbad bei 50°C eingengt.

Cytidindiphosphatcholin ließ sich mit Dragendorffs Reagenz nicht anfärben. Es blieb an der Auftragsstelle liegen und wurde mit Wasser über 12 h eluiert und bei 50°C eingengt.

8.2 Hydrolyse des Phosphorylcholins und Cytidindiphosphatcholins (13)

PC und CDP-Ch wurden mit saurer Phosphatase hydrolysiert.

Hierzu wurden die Proben mit 2 mg/ml saurer Phosphatase (Biochemica Boehringer) in Acetatpuffer bei pH 5,6 und 37°C 90 Minuten im Wasserbad inkubiert und zur anschließenden Ionenpaarextraktion eingeengt.

8.3 Ionenpaarextraktion (38)

Eine zusätzliche Reinigung des Cholinanteils aus PC und CDP-Ch wurde durch Ionenpaarextraktion erreicht.

Hierzu wurden die Proben in 1 ml Dipicrylamin-Puffer (pH 7,2) gelöst und mit 6 ml Dichlormethan geschüttelt. Bei alkalischem pH liegt Dipicrylamin in undissoziierter Form vor und bildet mit Cholin ein Ionenpaar. Dieser Komplex ist lipophil und löst sich in Dichlormethan. Mit Hilfe eines Phasentrennfilters der Fa. Schleicher und Schüll Nr. 2043 hy wurde dann das Dichlormethan von der wässrigen Phase getrennt. Durch Ansäuerung der Dichlormethanphase wurde die Ionenpaarbindung gelöst und das Cholin in die wässrige Phase überführt. Hiervon wurde ein Aliquot entnommen und eingeengt.

8.4 Messung der Radioaktivität

Die Proben wurden in 1 ml H₂O gelöst. 0,5 ml davon wurden mit 10 ml Dioxan-Szintillator (100 g Naphthalin, 10 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 0,25 g 2,2' Phenylen-bis-(5-phenyloxazol) (POPOP) pro 1 l Dioxan) aufgenommen.

Der Rest wurde zur Cholin-Bestimmung eingeengt (s. u.).

Die Impulse wurden in einem Packard Tricarb Flüssigkeitsszintillationszähler Modell 2650 gemessen.

Die Standardabweichung war $\leq 2,5 \%$.

8.5 Bestimmung der Cholinkonzentration (59)

Die eingeengten Proben wurden in 0,5 ml 0,1 n NaOH gelöst und gegen 3 ml Dipicrylamin in Dichlormethan (1 mg Dipicrylamin in 100 ml Dichlormethanolösung) ausgeschüttelt. 2,5 ml der Dichlormethanphase wurden abpipettiert, mit Na_2SO_4 entwässert und die Extinktion im Zeiss Photometer bei 420 nm gegen Dichlormethan gemessen.

Anhand einer Cholin-Eichreihe wurde die spezifische Extinktion bestimmt und daraus die Konzentration berechnet.

9 Wiederfindung der Radioaktivität

Die Wiederfindung von Radioaktivität, die Muskelgewebe zugesetzt wurde, das analog der oben beschriebenen Methode aufgearbeitet wurde, betrug für

$^3\text{H-Ch}$	86 %	± 6
$^{14}\text{C-PC}$	62 %	± 7
$^{14}\text{C-CDP-Ch}$	66 %	± 6
$^3\text{H-Lezithin}$	52 %	± 6

jeweils $n = 8$.

10 Berechnung der Umsatzgeschwindigkeiten

Die Berechnungen wurden nach ZILVERSMIT durchgeführt (56, 75).

Wenn

1. die Substanz A die einzige und unmittelbare Vorstufe der Substanz B ist ($\rightarrow A \rightarrow B \rightarrow$),
2. ein steady-state herrscht mit $v_{AB} = v_{BN} = v$
 (v_{AB} = Umsatzgeschwindigkeit von A nach B)
 (v_{BN} = Umsatzgeschwindigkeit von B zu allen Folgeprodukten)
3. die Umsatzgeschwindigkeiten im untersuchten Zeitraum konstant sind,

dann kann eine precursor-successor Beziehung zwischen A und B angenommen werden, die sich durch die Gleichung

$$\frac{d SA_B}{dt} = \frac{v \cdot SA_A - v \cdot SA_B}{c_B} \quad (1)$$

darstellen läßt.

Dabei bedeuten:

- SA_A = Spezifische Aktivität von A (in dpm/nmol)
 ermittelt durch Division der Aktivität von A (dpm/g) durch die Konzentration von A (nmol/g)
- SA_B = Spezifische Aktivität von B
- c_B = Konzentration von B (nmol/g)
- v = Umsatzgeschwindigkeit = $v_{AB} = v_{BN}$.

Durch Integration erhält man:

$$SA_{B_2} - SA_{B_1} = \frac{v \int_1^2 SA_A dt - v \int_1^2 SA_B dt}{c_B} \quad (2)$$

durch Auflösen nach v:

$$v = \frac{(SA_{B_2} - SA_{B_1}) c_B}{\int_1^2 SA_A dt - \int_1^2 SA_B dt} \quad (3)$$

Die Umsatzgeschwindigkeit v läßt sich also berechnen, indem die Veränderung der spezifischen Aktivität des Successors B in einem bestimmten Zeitintervall

- multipliziert mit der Konzentration des Successors - dividiert wird durch die Fläche F zwischen den Kurven von Precursor A und Successor B im selben Zeitintervall.

Die Fläche läßt sich aus den Werten der spezifischen Aktivitäten annähernd berechnen. In der Nähe des Maximums des Successors wird die Berechnung ungenau, da die Fläche zwischen den beiden Kurven gegen 0 geht und somit $v \rightarrow \infty$ (Abb. 8a).

Die Umsatzzeit einer Verbindung läßt sich aus ihrer Umsatzgeschwindigkeit und Konzentration berechnen:

$$t = \frac{c_B}{v_{AB}} \quad (4)$$

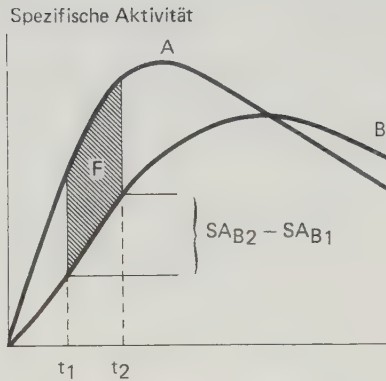


Abb. 8a

Darstellung der Beziehung der spezifischen Aktivität von Precursor A zu Successor B
(nach Zilversmit, 75)

11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Tests nach Student. Veränderungen mit $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

III ERGEBNISSE

1 Die Konzentrationen im Blut und in der Skelettmuskulatur und deren Beeinflussung durch Denervierung

1.1 Die Konzentration von Cholin im Blut (Tab. 1)

Bei unbehandelten Kontrolltieren betrug die CholinKonzentration im Blut 12,2 nmol/g Blut.

Bei operierten Tieren war die CholinKonzentration im Blut signifikant um 30 % auf 15,9 nmol/g Blut erhöht.

1.2 Die Konzentrationen von Ch, PC, CDP-Ch, Lez und GPC im Skelettmuskel (Tab. 1)

Die Konzentrationen der wasserlöslichen Verbindungen Ch, PC, CDP-Ch, GPC im Skelettmuskel der nicht operierten Kontrolltiere betragen pro Gramm Feuchtgewicht 70 nmol Ch, 69 nmol PC, 30 nmol CDP-Ch und 46 nmol GPC.

Die Lezithinkonzentration betrug 7670 nmol/g.

Im innervierten Muskel der operierten Tiere waren die Konzentrationen von Ch, PC, GPC und Lez signifikant höher als bei den nicht operierten Tieren.

Ch war um 31 % auf 92 nmol/g, PC um 48 % auf 102 nmol/g, GPC um 35 % auf 62 nmol/g und Lez um 7 % auf 8170 nmol/g erhöht.

Im CDP-Ch fand sich keine Konzentrationsänderung.

Im denervierten Muskel kam es gegenüber dem kontralateralen innervierten Muskel zu einem signifikanten Konzentra-

Ver bindung	Konzentrationen (nmol Ch/g)			Veränderungen zwischen den Gruppen in Prozent und Irrtumswahrscheinlichkeit p					
	nicht operierte Tiere	operierte Tiere		Gruppe B zu A		Gruppe C zu B		Gruppe C zu A	
	Kontroll- muskel Gruppe A	innerv. Muskel Gruppe B	denerv. Muskel Gruppe C						
Ch	70 $\pm$ 14	92 $\pm$ 21 *	134 $\pm$ 24 *	+31 %	p<0,001	+46 %	p<0,001	+90 %	p<0,001
PC	69 $\pm$ 10	102 $\pm$ 16	104 $\pm$ 12	+48 %	p<0,001	+ 2 %	p>0,1	+50 %	p<0,001
CDP-Ch	30 $\pm$ 5	33 $\pm$ 7	31 $\pm$ 3	+10 %	p<0,1	- 1 %	p>0,1	+ 1 %	p>0,1
Lez	7670 $\pm$ 470	8170 $\pm$ 340	7680 $\pm$ 360	+ 7 %	p<0,001	- 6 %	p<0,001	0 %	
GPC	46 $\pm$ 9	62 $\pm$ 12	68 $\pm$ 7	+35 %	p<0,001	+10 %	p>0,1	+47 %	p<0,001

Tab. 1: Konzentrationen von Cholin, Phosphorylcholin, CDP-Cholin, Lecithin und Glycerophosphorylcholin im M. gastrocnemius von nicht operierten Ratten und von operierten Ratten auf der denervierten und der innervierten Seite.

Mittelwerte mit Standardabweichung

n = 20 * n = 38

Die Konzentration des Cholins im Blut der nicht operierten Ratten betrug 12,2 $\pm$ 3,1 nmol/g; bei operierten Ratten betrug die Konzentration 15,9 $\pm$ 1,8 nmol/g.

Die Zunahme bei den operierten Ratten beträgt 30 %, p<0,001.

tionsanstieg des freien Cholins um 46 % auf 134 nmol/g. Außerdem fand sich eine signifikante Verminderung des Lezithins um 6 %. PC, CDP-Ch und GPC lagen im denervierten Muskel in der gleichen Konzentration vor wie im innervierten Muskel.

Verglichen mit der Konzentration im M. gastrocnemius von Kontrolltieren war der Cholingehalt des denervierten Muskels um 90 % auf 134 nmol/g erhöht.

2 Der Einbau von ^3H -Cholin in cholinhaltige Verbindungen des Skelettmuskels (Tab. 3, Abb. 9, 10)

2.1 Unbehandelte Tiere

Die spezifische Aktivität des Cholins im Blut fiel von 16000 dpm/nmol 6 Min. nach der Injektion des markierten Cholins auf 1860 dpm/nmol nach 30 Min. ab.

Die spezifische Aktivität des Cholins im Muskel betrug 6 Min. nach der Injektion nur 1/4 von der des Cholins im Blut, aber nach 19 Min. schnitten sich beide Kurven, d. h., die spezifischen Aktivitäten waren gleich.

Die spezifische Aktivität des PC im Muskel erreichte ihr Maximum nach 10 Min. (Abb. 9). Die Kurve des zeitlichen Verlaufes wurde von der des Cholins, des unmittelbaren Precursors, nach 7 Min. geschnitten.

Nach Gleichung 3 wurde die Phosphorylierungsgeschwindigkeit für Zeitintervalle von 6 bis 30 Min. berechnet. Die mittlere Bildungsgeschwindigkeit von Phosphorylcholin betrug 9,8 nmol/g/min (Tab. 2a).

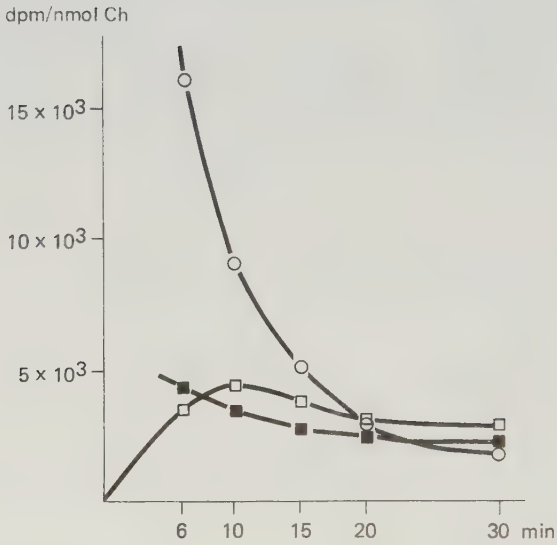


Abb. 9

Spezifische Aktivität des Cholins im Blut und im M.gastrocnemius sowie des Phosphorylcholins im M.gastrocnemius von unbehandelten Ratten

Standardabweichung s. Tab. 3

$n = 3 - 4$

○ Blut - Ch

■ Muskel - Ch

□ Muskel - PC

Zeit Min.	Verbindung				
	Blut Ch	Ch	PC	Muskel Lez	GPC
6	16000 $\pm$ 2310	4250 $\pm$ 470	3550 $\pm$ 240	6,0 $\pm$ 0,6	33 $\pm$ 7*
10	9000 $\pm$ 1000	3400 $\pm$ 1310	4620 $\pm$ 600	13,7 $\pm$ 2,7	47 $\pm$ 9
15	4900 $\pm$ 680	2750 $\pm$ 360	3750 $\pm$ 370	11,9 $\pm$ 1,4*	50 $\pm$ 10*
20	2830 $\pm$ 380	2300 $\pm$ 530	3150 $\pm$ 380	14,3 $\pm$ 2,4*	-
30	1860 $\pm$ 500	2160 $\pm$ 310	2960 $\pm$ 460	19,6 $\pm$ 5,1*	-

Tab. 3: Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch) von cholinhaltigen Verbindungen des Blutes und des Skelettmuskels von unbehandelten Kontrolltieren in Zeitintervallen von 6 bis 30 Minuten nach Injektion von 68 μ Ci 3 H-Cholin/100 g Körpergewicht i.v.

Mittelwerte mit Standardabweichung

n = 4 * n = 3

Zeit- intervall min	v (nmol/g/min)		
	nicht operierte Tiere Kontroll- muskel	operierte Tiere	
		innerv. Muskel	denerv. Muskel
2 - 4	-	2,98*	3,59
4 - 6	-	6,36	4,4
6 - 8	-	6,59	4,56
8 - 10	-	10,2	3,55
6 - 10	34,7*	8,26	4,09
10 - 15	10,8	6,25	4,17
15 - 20	8,95	1,8*	4,24
20 - 30	1,6*	83,3*	1,62*
$\bar{v} \pm SD$	9,8 $\pm$ 1,3	7,4 $\pm$ 1,9	4,1 $\pm$ 0,4

Tab. 2a: Umsatzgeschwindigkeit im M. gastrocnemius für die Reaktion $Ch \rightarrow PC$ von nicht operierten Kontrolltieren und von operierten Tieren auf der denervierten und der innervierten Seite

$p < 0,005$ innerv./denerv.

$p > 0,1$ Kontrollmuskel/innerv.

* : bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt

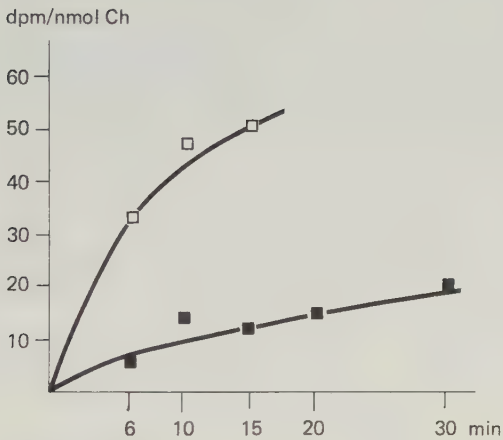


Abb. 10

Spezifische Aktivität des Lezithins und des Glycerophosphorylcholins im M.gastrocnemius von unbehandelten Ratten.

Standardabweichung s. Tab. 3

■ Lez □ GPC

n = 4

Bei einer PC-Konzentration von 69 nmol/g ergab sich eine Umsatzzeit des PC-Pools von 7 Minuten.

Die spezifischen Aktivitäten von Lezithin und GPC betrugen ca. 1/100 von der des freien Cholins.

Im Lezithin stieg die spezifische Aktivität während der Beobachtungszeit von 30 Min. langsam linear an (Abb. 10).

Dagegen ist im GPC bis 10 Min. ein wesentlich steilerer Anstieg zu sehen, so daß die spezifische Aktivität im GPC 15 Min. nach der Injektion des markierten Cholins 4 x so hoch lag wie im Lezithin des Muskels.

Die mittlere Bildungsgeschwindigkeit von Lezithin aus PC betrug 1,34 nmol/g/min (Tab. 2b).

Daraus ergab sich eine Umsatzzeit des Lezithinpools von 96 Stunden.

Zeit- intervall min	v (nmol/g/min)		
	nicht operierte Tiere	operierte Tiere	
	Kontroll- muskel	innerv. Muskel	denerv. Muskel
6 - 10	1,88	3,15	2,18
10 - 15	1,29	2,03	2,27
15 - 20	1,1	2,0	2,58
20 - 30	1,1	2,51	2,32
$\bar{v} \pm \text{SD}$	1,34 $\pm 0,4$	2,42 $\pm 0,5$	2,34 $\pm 0,2$

Tab. 2b: Umsatzgeschwindigkeit im M. gastrocnemius für die Reaktion $\text{PC} \rightarrow \text{Lez}$ von nicht operierten Kontrolltieren und von operierten Tieren auf der denervierten und der innervierten Seite
 $p < 0,02$ Kontrollmuskel/innerv.

2.2 Vorbehandelte, d. h., 24 h vorher auf der rechten Seite denervierte Tiere

Blut-Cholin (Tab. 4, Abb. 11)

Das Blut der Tiere, deren rechter Nervus ischiadicus durchtrennt wurde, enthielt nach der Injektion mehr Radioaktivität als das Blut der nicht operierten Tiere. Jedoch waren die spezifischen Aktivitäten des Cholins im Blut beider Gruppen - der operierten und der nicht operierten - etwa gleich, weil auch die Cholinkonzentration im Blut der operierten Tiere höher war als bei nicht operierten Tieren.

Muskel-Cholin (Tab. 5, Abb. 12, 14)

Die spezifischen Aktivitäten des Cholins in denervierten Muskeln waren etwa die gleichen wie bei den nicht operierten Kontrolltieren, obwohl der Cholingehalt der denervierten Muskeln knapp doppelt so hoch lag wie bei den nicht operierten Kontrolltieren.

Dagegen lag die spezifische Aktivität im Cholin der innervierten Mm. gastrocnemii der operierten Tiere anfangs doppelt so hoch wie in den denervierten Muskeln oder in denen der nicht operierten Kontrolltiere.

Muskel-PC (Tab. 6, Abb. 13, 14)

Anders lagen die Relationen bei den spezifischen Aktivitäten im PC der verschieden behandelten Muskeln.

Bei den nicht operierten Kontrolltieren fand sich bereits nach 10 Min. das Maximum. Bei operierten Tieren war das Maximum auf der innervierten Seite erst nach 18 Min. er-

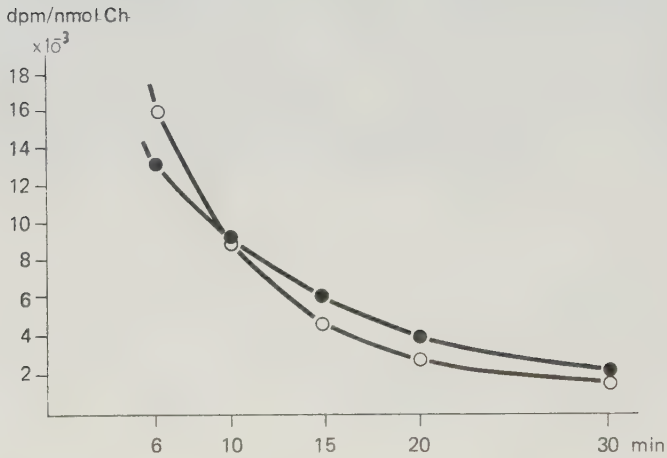


Abb. 11

Spezifische Aktivität des Cholins im Blut von nicht operierten Ratten und von operierten Ratten

Standardabweichung s. Tab. 4

n = 4

- nicht operierte Ratten
- operierte Ratten

Tabelle 4

Zeit Min.	dpm/nmol Ch		Veränderungen* und Irrtums- wahrscheinlichkeit p	
	nicht operierte Tiere	operierte Tiere		
6	16000 $\pm$ 2310	13090 $\pm$ 1020	- 18 %	p < 0,05
10	9000 $\pm$ 1000	9120 $\pm$ 1060	+ 1 %	p > 0,1
15	4900 $\pm$ 680	5960 $\pm$ 520	+ 22 %	p < 0,05
20	2830 $\pm$ 380	3970 $\pm$ 280	+ 40 %	p < 0,005
30	1860 $\pm$ 500	2210 $\pm$ 210	+ 18 %	p > 0,1

Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch) des Cholins im Blut von nicht operierten Kontrolltieren und von operierten Tieren in Zeitintervallen von 6 bis 30 Minuten nach Injektion von 68 μ Ci 3 H-Cholin/100 g Körpergewicht i.v.

Mittelwerte mit Standardabweichung

n = 4

* in Prozent zu den nicht operierten Tieren

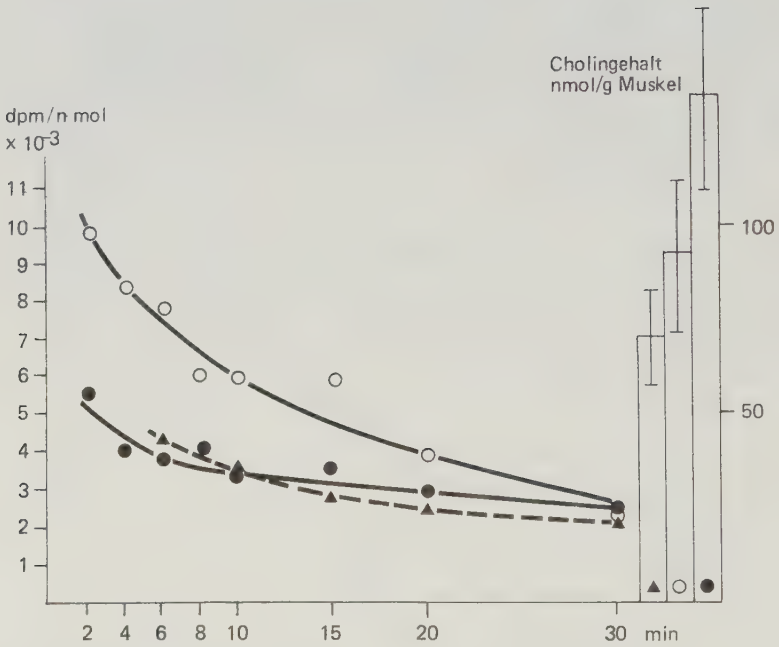


Abb. 12

Spezifische Aktivität und Konzentration des Cholins im M.gastrocnemius von nicht operierten Ratten und von operierten Ratten auf der denervierten und der inner-vierten Seite

Standardabweichung s. Tab. 5

$n = 3 - 7$

- ▲ Muskeln nicht operierter Tiere
- innervierte Muskeln operierter Tiere
- denervierte Muskeln operierter Tiere

Zeit Min.	Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch)			Veränderungen zwischen den Gruppen in Prozent und Irrtumswahrscheinlichkeit p		
	nicht operierte Tiere	operierte Tiere		Gruppe B zu A	Gruppe C zu B	Gruppe C zu A
	Kontroll- muskel Gruppe A	innerv. Muskel Gruppe B	denerv. Muskel Gruppe C			
2	-	9820 $\pm$ 1110	5460 $\pm$ 390	-	-44 % p<0,005	-
4	-	8310 $\pm$ 530	4120 $\pm$ 560	-	-50 % p<0,001	-
6	4250 $\pm$ 470	7700 $\pm$ 720	3710 $\pm$ 300	+83 % p<0,001	-52 % p<0,001	-13 % p>0,1
8	-	6010 $\pm$ 230	3910 $\pm$ 380	-	-35 % p<0,001	-
10	3400 $\pm$ 1310	5840 $\pm$ 1160	3240 $\pm$ 240	+72 % p<0,025	-44 % p<0,001	-4 % p>0,1
15	2750 $\pm$ 360	5060 $\pm$ 1020	3620 $\pm$ 220	+113 % p<0,005	-38 % p<0,01	+32 % p<0,02
20	2300 $\pm$ 530	3760 $\pm$ 420	3020 $\pm$ 420	+64 % p<0,01	-20 % p<0,05	+31 % p<0,1
30	2160 $\pm$ 310	2240 $\pm$ 450	2380 $\pm$ 320	+4 % p>0,1	+6 % p>0,1	+10 % p>0,1

Tab. 5: Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch) des Cholins im M. gastrocnemius von nicht operierten Ratten und von operierten Ratten auf der denervierten und der innervierten Seite in Zeitintervallen von 2 bis 30 Minuten nach Injektion von 68 μ Ci 3 H-Cholin/100 g Körpergewicht i.v.

Mittelwerte mit Standardabweichung

n = 4

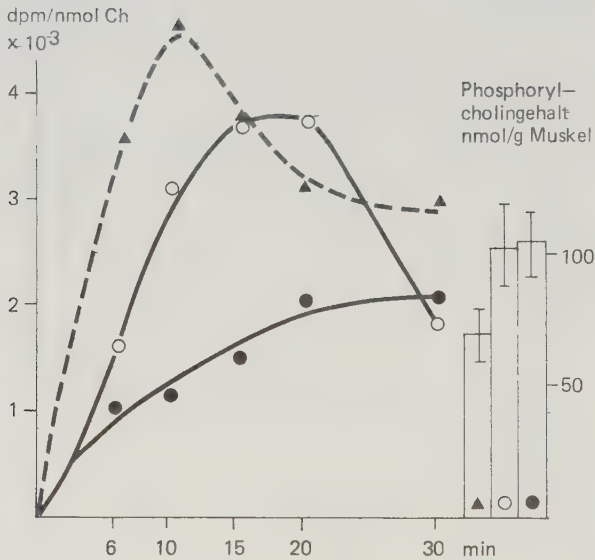


Abb. 13

Spezifische Aktivität und Konzentration des Phosphorylcholins im M.gastrocnemius von nicht operierten Ratten und von operierten Ratten auf der denervierten und der innervierten Seite

Standardabweichung s. Tab. 6

n = 3 – 7

- ▲ Muskeln nicht operierter Tiere
- innervierte Muskeln operierter Tiere
- denervierte Muskeln operierter Tiere

Zeit Min.	Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch)			Veränderungen zwischen den Gruppen in Prozent und Irrtumswahrscheinlichkeit p		
	nicht operierte Tiere	operierte Tiere		Gruppe B zu A	Gruppe C zu B	Gruppe C zu A
	Kontroll- muskel Gruppe A	innerv. Muskel Gruppe B	denerv. Muskel Gruppe C			
6	3550 $\pm$ 240	1580 $\pm$ 210	990 $\pm$ 230	-56 % p<0,001	-37 % p<0,01	-72 % p<0,001
10	4620 $\pm$ 600	3100 $\pm$ 580	1150 $\pm$ 130	-33 % p<0,02	-63 % p<0,001	-75 % p<0,001
15	3750 $\pm$ 370	3690 $\pm$ 740*	1480 $\pm$ 260	- 2 % p>0,1	-60 % p<0,005	-61 % p<0,001
20	3150 $\pm$ 380	3740 $\pm$ 300*	1990 $\pm$ 320	+19 % p<0,1	-47 % p<0,001	-37 % p<0,005
30	2960 $\pm$ 460	1780 $\pm$ 190*	1990 $\pm$ 500	-40 % p<0,01	+11 % p<0,1	-33 % p<0,05

Tab. 6: Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch) des Phosphorylcholins im M. gastrocnemius von nicht operierten Ratten und von operierten Ratten auf der denervierten und auf der innervierten Seite in Zeitintervallen von 6 bis 30 Minuten nach Injektion von 68 μ Ci 3 H-Cholin/100 g Körpergewicht i.v.

Mittelwerte mit Standardabweichung

n = 4 * n = 3

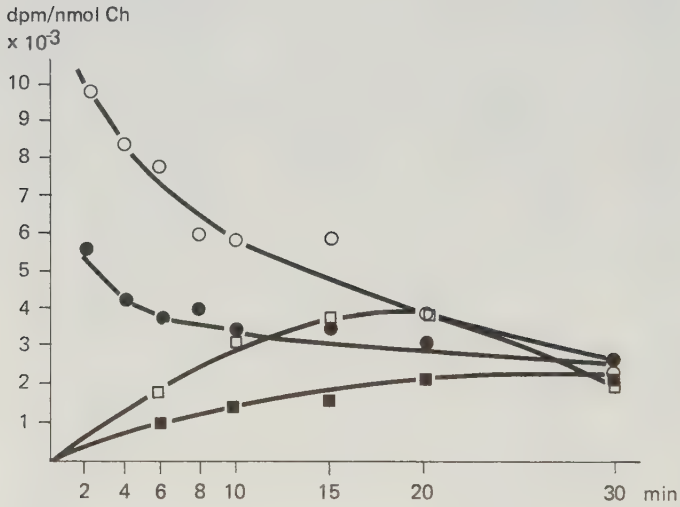


Abb. 14

Spezifische Aktivität des Cholins und Phosphorylcholins im denervierten und im kontralateralen innervierten M. gastrocnemius

Standardabweichung s. Tab. 5, 6

n = 3 – 7

○ Ch innervierte Muskeln ● Ch denervierte Muskeln
 □ PC innervierte Muskeln ■ PC denervierte Muskeln

reicht und auf der denervierten Seite nach mehr als 30 Min., so daß es in der Beobachtungszeit gar nicht erfaßt werden konnte.

Bei den operierten Tieren betrug die Phosphorylierungsgeschwindigkeit auf der innervierten Seite 7,4 nmol/g/min. Auf der denervierten Seite war sie signifikant um ca. 45 % auf 4,1 nmol/g/min vermindert (Tab. 2a).

Der PC-Pool wurde bei gleicher PC-Konzentration im innervierten Muskel in 14 Min. und im denervierten Muskel in 25 Min. umgesetzt.

Muskel-CDP-Ch (Tab. 7, Abb. 15)

Die spezifische Aktivität des CDP-Cholins im denervierten Muskel war signifikant geringer als im kontralateralen innervierten Muskel. Das Maximum der spezifischen Aktivität war im innervierten Muskel nach 16 Min. erreicht, während es im denervierten Muskel bei 25 Min. lag.

Muskel-Lezithin (Tab. 8, Abb. 16)

Die spezifischen Aktivitäten des Lezithins im denervierten Muskel und im kontralateralen innervierten Muskel stiegen während der Beobachtungszeit an. Auf der denervierten Seite war die spezifische Aktivität signifikant geringer und die Steilheit des Anstiegs war etwa halb so groß.

Die spezifische Aktivität des Lezithins von denervierten Muskeln lag signifikant unterhalb der spezifischen Aktivität des Lezithins von Muskeln nicht operierter Kontrolltiere.

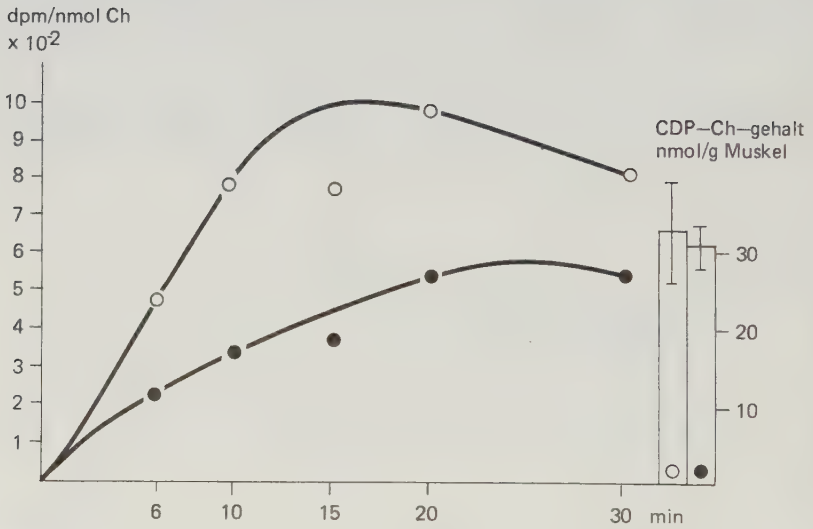


Abb. 15

Spezifische Aktivität und Konzentration des Cytidindiphosphatcholins im denervierten und im kontralateralen innervierten M.gastrocnemius

Standardabweichung s. Tab. 7

n = 3 - 4

○ innervierte Muskeln

● denervierte Muskeln

Tabelle 7

Zeit Min.	dpm/nmol Ch		Veränderungen ^{**} und Irrtums- wahrscheinlichkeit p	
	innerv. Muskel	denerv. Muskel		
6	470 $\pm$ 110 [*]	240 $\pm$ 45	- 49 %	p < 0,02
10	820 $\pm$ 110 [*]	330 $\pm$ 70	- 60 %	p < 0,001
15	770 $\pm$ 85 [*]	360 $\pm$ 70	- 53 %	p < 0,001
20	970 $\pm$ 200 [*]	530 $\pm$ 95	- 45 %	p < 0,02
30	810 $\pm$ 125 [*]	520 $\pm$ 130	- 36 %	p < 0,05

Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch) des Cytidindiphosphat-cholins im M. gastrocnemius von operierten Ratten auf der denervierten und auf der innervierten Seite in Zeitintervallen von 6 bis 30 Minuten nach Injektion von 68 μ Ci 3 H-Cholin/100 g Körpergewicht i.v.

Mittelwerte mit Standardabweichung

n = 4 * n = 3

^{**} in Prozent zum innervierten Muskel

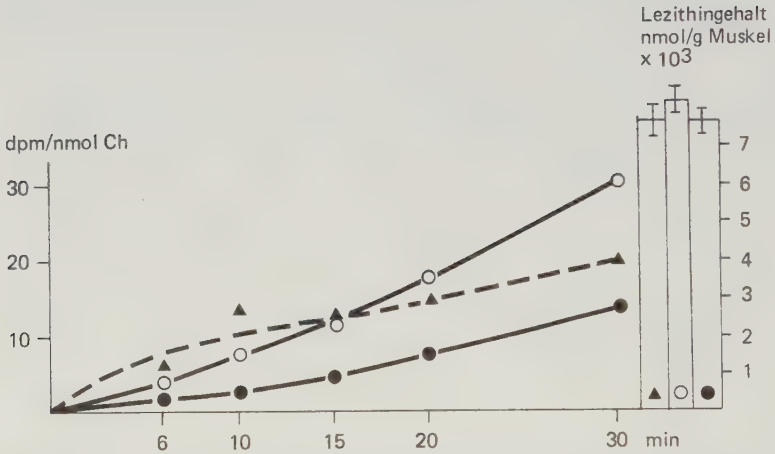


Abb. 16

Spezifische Aktivität und Konzentration des Lezithins im M.gastrocnemius von nicht operierten Ratten und von operierten Ratten auf der denervierten und der innervierten Seite

Standardabweichung s. Tab. 8

n = 3 - 4

- ▲ Muskeln nicht operierter Tiere
- innervierte Muskeln operierter Tiere
- denervierte Muskeln operierter Tiere

Zeit Min.	Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch)			Veränderungen zwischen den Gruppen in Prozent und Irrtumswahrscheinlichkeit p		
	nicht operierte Tiere		operierte Tiere	Gruppe B zu A	Gruppe C zu B	Gruppe C zu A
	Kontroll- muskel Gruppe A	innerv. Muskel Gruppe B				
6	6,0 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,7*	denerv. Muskel Gruppe C	-43 % p<0,01	-62 % p<0,005	-78 % p<0,001
10	13,7 $\pm$ 2,7	7,0 $\pm$ 1,5		-49 % p<0,01	-64 % p<0,005	-82 % p<0,001
15	11,9 $\pm$ 1,4*	11,2 $\pm$ 1,9		- 1 % p>0,1	-59 % p<0,001	-61 % p<0,001
20	14,3 $\pm$ 2,4*	17,6 $\pm$ 1,8*		+23 % p>0,1	-58 % p<0,001	-48 % p<0,005
30	19,6 $\pm$ 5,1*	30,2 $\pm$ 6	13,3 $\pm$ 2,1*	+54 % p<0,1	-56 % p<0,001	-32 % p>0,1

Tab. 8: Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch) des Lezithins im M. gastrocnemius von nicht operierten Ratten und von operierten Ratten auf der denervierten und auf der innervierten Seite in Zeitintervallen von 6 bis 30 Minuten nach Injektion von 68 μ Ci ^3H -Cholin/100 g Körpergewicht i.v.

Mittelwerte mit Standardabweichung

n = 4 * n = 3

In den innervierten Muskeln operierter Tiere war die spezifische Aktivität des Lezithins bis 15 Min. Inkorporationszeit kleiner und für 20 und 30 Min. größer als die spezifische Aktivität von Muskeln nicht operierter Kontrolltiere.

Die Bildungsgeschwindigkeiten von Lezithin waren für innervierte und denervierte Muskeln von operierten Tieren annähernd gleich.

Für den innervierten Muskel betrug sie 2,42 nmol/g/min und für den denervierten Muskel 2,34 nmol/g/min. (Tab. 2b). Die entsprechenden Umsatzzeiten waren 56 bzw. 55 Stunden.

Muskel-GPC (Tab. 9, Abb. 17)

Die spezifischen Aktivitäten des GPC waren bei nicht operierten Kontrolltieren und den innervierten Muskeln der operierten Tiere etwa gleich groß und während der Beobachtungszeit ansteigend.

Die spezifische Aktivität des GPC in den denervierten Muskeln lag signifikant darunter. Die Steilheit des Anstiegs war etwa halb so groß.

In allen Fällen lag die spezifische Aktivität des GPC ca. 3 x so hoch wie die des Lezithins.

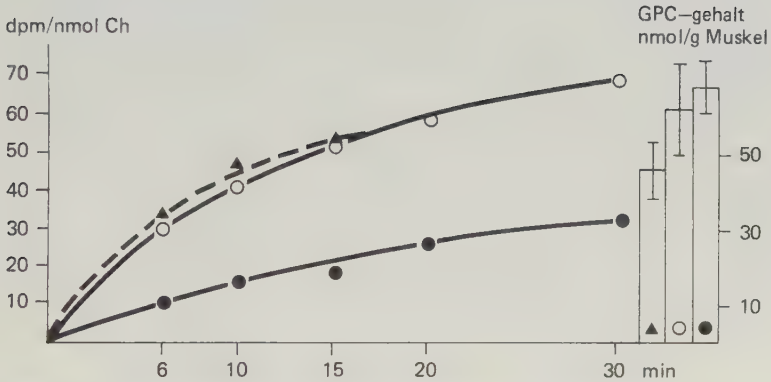


Abb. 17

Spezifische Aktivität und Konzentration des Glycerophosphorylcholins im M.gastrocnemius von nicht operierten Ratten und von operierten Ratten auf der innervierten und der denervierten Seite

Standardabweichung s. Tab. 9

n = 3 – 4

- ▲ Muskeln nicht operierter Tiere
- innervierte Muskeln operierter Tiere
- denervierte Muskeln operierter Tiere

Zeit Min.	Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch)			Veränderungen zwischen den Gruppen in Prozent und Irrtumswahrscheinlichkeit p		
	nicht operierte Tiere	operierte Tiere		Gruppe B zu A	Gruppe C zu B	Gruppe C zu A
	Kontroll- muskel Gruppe A	innerv. Muskel Gruppe B	denerv. Muskel Gruppe C			
6	33 $\pm$ 7*	30 $\pm$ 5	10 $\pm$ 1	-10 % p>0,1	-66 % p<0,001	-60 % p<0,005
10	47 $\pm$ 9	42 $\pm$ 8,6	14 $\pm$ 2,1	-10 % p>0,1	-66 % p<0,005	-70 % p<0,001
15	50 $\pm$ 10*	50 $\pm$ 6*	18 $\pm$ 2,4	0 %	-65 % p<0,001	-64 % p<0,005
20	-	60 $\pm$ 8	25 $\pm$ 3,8	-	-59 % p<0,001	-
30	-	70 $\pm$ 8,4	33 $\pm$ 4,2	-	-53 % p<0,001	-

Tab. 9: Spezifische Aktivität (dpm/nmol Ch) des Glycerophosphorylcholins im M. gastrocnemius von nicht operierten Ratten und von operierten Ratten auf der denervierten und auf der innervierten Seite in Zeitintervallen von 6 bis 30 Minuten nach Injektion von 68 μ Ci 3 H-Cholin/100 g Körpergewicht i.v.

Mittelwerte mit Standardabweichung

n = 4 * n = 3

3 Einfluß des bei der Denervierungsoperation
erfolgten Muskelschnittes und der Äthernarkose
auf den Einbau von ^3H -Cholin (Abb. 18)

Da die Versuchstiere zur Denervierung eine Äthernarkose erhalten hatten und ein Muskelschnitt angelegt werden mußte, wurde untersucht, ob diese beiden Faktoren Veränderungen verursachen.

Es wurden 3 Gruppen mit je 5 Versuchstieren gebildet:

Gruppe A: Den Versuchstieren wurde auf der rechten Seite an üblicher Stelle nach Äthernarkose ein Haut- und Muskelschnitt zur Freilegung des N. ischiadicus beigebracht. Danach wurde die Wunde verschlossen.

Gruppe B: Die Versuchstiere erhielten nur eine Äthernarkose, die in ihrer Dauer der einer Denervierungsoperation entsprach.

Gruppe C: Die Versuchstiere erhielten weder Muskelschnitt noch Äthernarkose.

24 h nach dem Muskelschnitt bzw. der Äthernarkose erhielten die Tiere aller 3 Gruppen $37\ \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Cholin in $200\ \mu\text{l}$ 0,9 % Kochsalzlösung pro 100 g Körpergewicht i.v. injiziert. Die Inkorporationszeit betrug für alle Gruppen 15 Minuten. Es wurden jeweils Muskelproben von beiden Beinen untersucht.

Ergebnisse:

Im Blut fanden sich in der CholinKonzentration und in der spezifischen Aktivität des Cholins zwischen den 3 Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Im Muskel unterschieden sich die Konzentrationen von Ch, PC, CDP-Ch, Lez, GPC und die spezifischen Aktivitäten dieser Verbindungen zwischen den 3 Gruppen und zwischen beiden Beinen derselben Gruppe nicht voneinander.

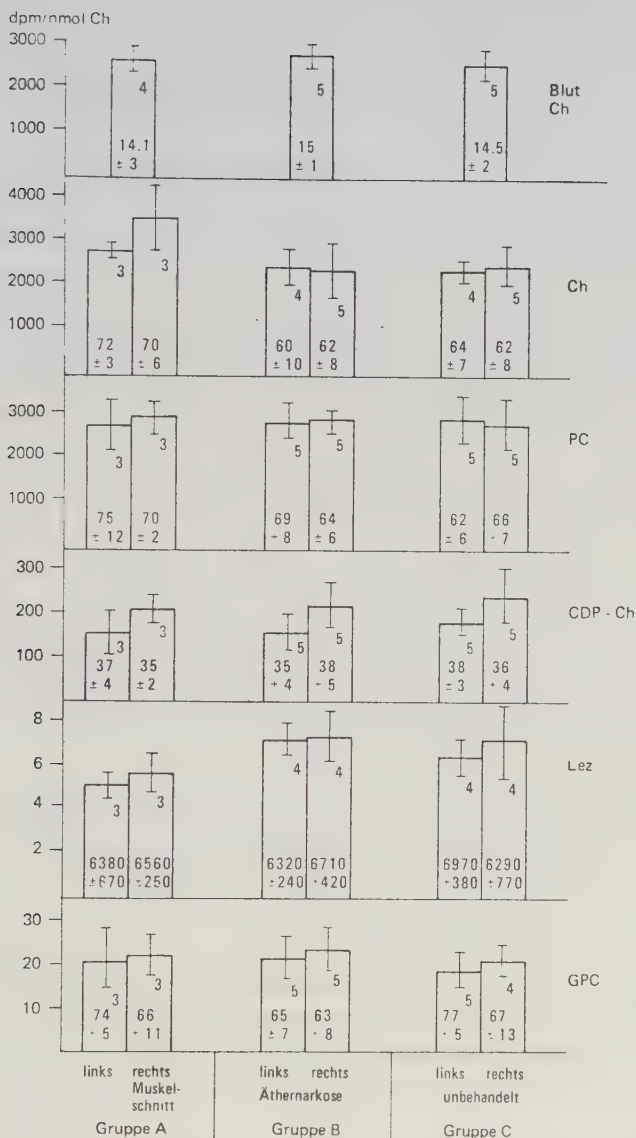


Abb. 18

Vergleich des Einbaus von Cholin in cholinhaltige Verbindungen des M.gastrocnemius von Ratten, die A) einen Muskelschnitt rechts oder B) eine Äthernarkose erhielten oder C) unbehandelt waren.

Aktivität : $37 \mu \text{Ci } ^3\text{H} - \text{Cholin} / 100 \text{ g Körpergewicht i.v.}$

Inkorporationszeit 15 min.

Mittelwerte mit Standardabweichung

Im Säulenfuß Konzentration : SD

Im Säulenkopf Anzahl der Proben

IV DISKUSSION

1 Einfluß von Äthernarkose und Muskelschnitt

Da die Versuchstiere zur Denervierung eine Äthernarkose und einen Muskelschnitt erhielten, mußte der Einfluß dieser Faktoren auf die Konzentrationen und die spezifischen Aktivitäten der untersuchten Substanzen bestimmt werden.

Es zeigte sich, daß weder Äthernarkose noch Muskelschnitt Veränderungen in den Konzentrationen und spezifischen Aktivitäten hervorriefen.

2 Nicht operierte Tiere

2.1 Konzentration

Die Konzentrationen von cholinhaltigen Verbindungen des Skelettmuskels der Ratte und der Einbau von radiomarkierten Vorstufen wurde erstmals von SCHWARTZKOPFF (62) und MÜCK (49) untersucht.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Konzentrationen im Blut und im Skelettmuskel stimmen weitgehend mit den dort angegebenen überein.

Während SCHWARTZKOPFF und MÜCK jedoch das Lipidcholin, d. h., alle cholinhaltigen Lipide - Lezithin, Sphingomyelin, Lysolezithin und Plasmalogen - bestimmt haben, wurde in dieser Arbeit nur Lezithin untersucht.

Die gefundene Lezithinkonzentration stimmt mit den Werten in der Literatur überein (20).

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das CDP-Cholin untersucht. Vergleichende Werte über das CDP-Cholin des Skelettmuskels der Ratte wurden in der Literatur nicht gefunden.

2.2 Spezifische Aktivität

Bei der Untersuchung der spezifischen Aktivität des Cholins im Blut zeigte sich, daß Cholin einen sehr schnellen Umsatz hat. Wie schon bei SCHWARTZKOPFF (62) wurden 20 Min. nach der i.v. Injektion von radiomarkiertem Cholin nur noch 1 % der Radioaktivität im Blut gefunden. Zu diesem Zeitpunkt waren die spezifischen Aktivitäten des Cholins im Blut und im Skelettmuskel gleich. Das deutet auf einen schnellen Cholinaustausch zwischen beiden Kompartimenten hin.

Für den folgenden Syntheseschritt $\text{Ch} \rightarrow \text{PC}$ läßt sich eine Precursor-Successor Beziehung annehmen, da die Kurve der spezifischen Aktivität des Cholins die des Phosphorylcholins im Bereich des Maximums bei 10 Minuten schneidet. Somit kann man annehmen, daß Cholin die einzige ins Gewicht fallende Vorstufe des Phosphorylcholins darstellt. Diese Annahme entspricht auch den Befunden von MÜCK (49), der einen Schnittpunkt beider Kurven bei etwa 12 Min. gefunden hat. Daraus geht hervor, daß Phosphoryläthanolamin nicht zu Phosphorylcholin methyliert wird.

Die berechnete Phosphorylierungsgeschwindigkeit von Cholin betrug im Muskel 9,8 nmol/g/min. Dies ist mehr als doppelt soviel wie MÜCK (49) angibt. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konzentrationsangaben für PC (MÜCK 30 nmol/g, vorliegende Arbeit 69 nmol/g) entsprechen sich

jedoch die Werte, da die Konzentration als Multiplikator in den Zähler von Gleichung 3 eingeht.

Wie schon bei MÜCK (49) und SCHWARTZKOPFF (62) war auch in dieser Arbeit die spezifische Aktivität des Lezithins deutlich niedriger als die des GPC. Eine Precursor-Successor Beziehung besteht demnach nicht. DAWSON (11) zeigte, daß GPC auch aus Lyso-Cholin-Plasmalogen entstehen kann. Cholin-Plasmalogene sind im Muskel in einer Konzentration von etwa 900 nmol/g enthalten (45). Jedoch haben Cholin-Plasmalogene verglichen mit Lezithinen einen sehr trägen Stoffwechsel (65), so daß eine Markierung von GPC über Cholin-Plasmalogene wenig wahrscheinlich erscheint.

Eine andere Erklärung für die höhere spezifische Aktivität des GPC wäre das Vorhandensein von unterschiedlichen Lezithinpools im Muskel. Tatsächlich ist der Lezithinpool nicht nur in seiner Fettsäurezusammensetzung heterogen (50), sondern auch in seinen Umsatzgeschwindigkeiten (26). Eine Lezithinfraktion mit hoher Umsatzgeschwindigkeit wäre dann für die höhere GPC-Markierung verantwortlich.

Die mittlere Einbaugeschwindigkeit von Phosphorylcholin ins Lezithin betrug 1,34 nmol/g/min. Vergleichbare Werte existieren in der Literatur nicht. Die von MÜCK (49) angegebenen 3,56 nmol/g/min beziehen sich auf den Einbau von Phosphorylcholin ins Lipidcholin (Lezithin, Sphingomyelin, Lysolezithin, Plasmalogen), so daß die Werte nur mit Einschränkung zu vergleichen sind.

Da Basenaustausch angenommen werden kann, lassen sich diese Umsatzgeschwindigkeiten nur unter Vorbehalt interpretieren.

3 Operierte Tiere

Denervierung eines Muskels führt zu morphologischen und funktionellen Veränderungen sowie zu Störungen des Muskelstoffwechsels.

Die ersten strukturellen Veränderungen nach Denervierung ereignen sich an der motorischen Endplatte.

Einen Tag nach Denervierung ist die Zahl der synaptischen Vesikel bereits um 10 % geringer (55).

Nach zwei (22) bis vier Tagen (55) sind die synaptischen Vesikel aus der Nervenendigung verschwunden.

Man kann also annehmen, daß auch schon 24 Stunden nach Denervierung ein gewisser Membranabbau stattfindet, der sich in der beobachteten Abnahme des Lezithingehaltes um 6 % ausdrückt. Dieser Befund wurde auch von HUMOLLER (30) erhoben.

Die Abnahme des Lezithingehaltes erklärt aber nicht den beobachteten Anstieg der CholinKonzentration im denervierten Muskel.

Bei einem Lezithingehalt von 7700 nmol/g würde zwar ein Abbau $\text{Lez} \rightarrow \text{Lysolez} \rightarrow \text{GPC} \rightarrow \text{Ch}$ (10) von nur 0,5 % ausreichen, um den Cholinanstieg zu verursachen, aber dann müßte auch der GPC-Gehalt ansteigen. Dies wurde nicht beobachtet.

Der Anstieg des Cholingehaltes im denervierten Muskel könnte durch einen gesteigerten Basenaustausch erklärt werden. Durch Austausch des im Lezithin gebundenen Cholins gegen Serin oder Äthanolamin nimmt die Konzentration des Lezithins ab und die des freien Cholins zu.

SCHWARTZKOPFF (62) konnte zeigen, daß der Basenaustausch im Muskel eine erhebliche Rolle spielt.

Der beobachtete Konzentrationsanstieg des Cholins im Blut der operierten Tiere kann nun besser erklärt werden.

Unmittelbar nach Durchtrennung des Nerven steigt im denervierten Muskel der Blutdurchfluß an. Dieser Anstieg ist durch den Verlust des vasokonstriktorisches Tonus bedingt (27). Außerdem nimmt die Anzahl geöffneter Kapillaren (28) sowie die Permeabilität der Kapillarwand zu (27). BOGATZKI konnte zeigen, daß auch die Permeabilität der Muskelzellmembran nach Denervierung zunimmt (6).

Das durch den gesteigerten Basenaustausch erhöhte Cholin des denervierten Muskels kann somit erleichtert zurück ins Blut übertreten und dort zur Erhöhung des Cholingehaltes beitragen.

KRAUPP (39), der eine erhöhte Cholinabgabe aus dem denervierten Muskel an das Blut nachwies, führte seine Ergebnisse auf eine Muskelatrophie zurück. Zu den von ihm untersuchten Zeiten nach Denervierung von 10 bis 20 Tagen liegt bereits eine beträchtliche Muskelatrophie vor, die sich u. a. in einem Gewichtsverlust bis zu 50 % äußert (52).

Nach 24-stündiger Denervierung, wie in der vorliegenden Arbeit, findet noch keine signifikante Muskelatrophie statt (52), so daß dieser Faktor bei der Interpretation der Ergebnisse keine Rolle spielt.

Im denervierten Muskel war die spezifische Aktivität des Cholins geringer als im kontralateralen innervierten Muskel. Diese Verminderung wird durch die erheblich höhere Konzentration des Cholins im denervierten Muskel verursacht.

Die deutlich geringere spezifische Aktivität des Phosphorylcholins im denervierten Muskel im Vergleich zum kontralateralen innervierten Muskel ist hingegen nicht konzentrationsbedingt, denn die Konzentrationen waren gleich.

Anhand der berechneten Umsatzgeschwindigkeiten des PC kann man erkennen, daß die Phosphorylierung von Cholin im denervierten Muskel verlangsamt ist. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen VARGAS (69), der eine Reduzierung der Phosphorylierung im denervierten Skelettmuskel beschrieben hat.

Die verlangsamte Phosphorylierung könnte durch eine Hemmung der Cholinase, die die Reaktion $\text{Ch} \rightarrow \text{PC}$ katalysiert, verursacht werden.

Von mehreren Enzymen ist bekannt, daß ihre Aktivität nach Denervierung abnimmt (3), doch wurden die Untersuchungen überwiegend nach Denervierungszeiten von mehr als einer Woche durchgeführt. Über die Cholinase existieren nach Denervierung keine Untersuchungen.

Jedoch kann die verlangsamte Phosphorylierung im denervierten Muskel auch auf einen Mangel an ATP zurückgeführt werden. LEVINE (43) und HUMOLLER (29) beschrieben einen Tag nach Denervierung eine ATP-Vermindering um 10 - 15 %.

Im denervierten Muskel wird der Energiestoffwechsel weniger effektiv. Der P:O-Quotient, als Ausdruck der Bereitstellung von ATP über die oxidative Phosphorylierung, wird kleiner bei gleichbleibendem Sauerstoffverbrauch (3, 43).

Als Ursache für den Effektivitätsverlust der Energiebereitstellung kommen Aktivitätsabnahmen von oxidativen Enzymen wohl kaum in Betracht. Zwar fand HUMOLLER (31)

u. a. eine Aktivitätsabnahme der Cytochromoxidase um 15 % schon nach 3-tägiger Denervierung, doch sind diese Enzyme physiologisch im Überschuß vorhanden.

Die Cytochromoxidase liegt im Muskel in mindestens zehnfachem Überschuß vor (60).

Morphologisch korreliert der ATP-Mangel mit einer Abnahme der Mitochondrienzahl (55). Mitochondrien produzieren 95 % des zellulären ATP-Bedarfs (40).

Die spezifischen Aktivitäten des CDP-Cholins, des Lezithins und des GPC waren im denervierten Muskel niedriger als im kontralateralen innervierten Muskel. Da in den drei Verbindungen zwischen denerviertem und innerviertem Muskel nur geringe Konzentrationsdifferenzen bestanden, muß die Abnahme der spezifischen Aktivität anders bedingt sein.

Da durch die verlangsamte Phosphorylierung weniger markiertes PC entsteht, sind auch die Folgeprodukte CDP-Cholin und Lezithin, sowie dessen Abbauprodukt GPC weniger markiert, d. h., die spezifische Aktivität ist geringer.

Die Geschwindigkeiten des Einbaus von PC ins Lezithin des denervierten und des kontralateralen innervierten Muskels waren gleich. Sie lagen fast doppelt so hoch wie die von Muskeln nicht operierter Kontrolltiere.

Betrachtet man den Verlauf der spezifischen Aktivität des Lezithins, so erkennt man, daß der Einbau von markiertem Cholin ins Lezithin bei operierten Tieren eine völlig andere Kinetik aufweist als bei nicht operierten Kontrolltieren und zwar sowohl auf der denervierten als auch auf der innervierten Seite.

In den ersten 10 - 15 Min. erfolgt bei den operierten Tieren ein langsamerer Einbau und von 15 - 30 Min. ein verstärkter Einbau von Cholin ins Lezithin.

Das könnte auf mehrere Lezithinkompartimente mit deutlich anderen Umsatzgeschwindigkeiten hindeuten.

Besonders stark sind diese Veränderungen in den inner-vierten Muskeln der operierten Tiere.

Der innervierte M. gastrocnemius der operierten Tiere wird durch den Ausfall des kontralateralen denervierten Muskels stärker beansprucht als z. B. die Mm. gastrocnemii von nicht operierten Kontrolltieren.

Muskeln, die durch den Ausfall anderer Muskeln über längere Zeit vermehrte Arbeit leisten, nehmen an Muskelmasse zu, d. h., sie hypertrophieren kompensatorisch (19).

JABLECKI (33) untersuchte an Muskeln, die kompensatorisch vermehrte Arbeit leisteten, den Einbau von markiertem Inositol ins Phosphatidylinositol. Er fand gegenüber Muskeln mit normaler Arbeitslast:

- a) einen leichten Anstieg der Phospholipide,
- b) schon nach 24 Stunden vermehrter Arbeit eine Anhäufung des markierten Inositols und eine verstärkte Markierung des Phosphatidylinositols.

Er führte diese Ergebnisse auf eine beginnende kompensatorische Hypertrophie zurück.

Entsprechend den Ergebnissen JABLECKIs (33) könnten auch der erhöhte Cholin- und Lezithingehalt sowie die verstärkte Markierung des Cholins und Lezithins im inner-vierten M. gastrocnemius der operierten Tiere gegenüber den nicht operierten Tieren erklärt werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Veränderungen im denervierten Muskel vermutlich primär an den motorischen Endplatten stattfinden und nicht an den Muskelzellmembranen. Dort können nach Denervierung frühestens nach 6 Tagen Veränderungen beobachtet werden (52), die über gesteigerte lysosomale Enzymaktivitäten zur Muskelatrophie führen (44).

Am kontralateralen innervierten Muskel finden die Veränderungen vermutlich an der Muskelfaser statt (19) und nicht an den motorischen Endplatten.

Die in der Einleitung gestellte Frage einer Veränderung des Lezithinstoffwechsels nach Denervierung kann mit den vorliegenden Ergebnissen nur im Hinblick auf die verlangsamt Phosphorylierung des Cholins zufriedenstellend beantwortet werden.

Die Veränderungen in der Kinetik des Lezithins - insbesondere in den innervierten Muskeln der operierten Tiere - sind mit dem Hinweis auf eine kompensatorische Hypertrophie sicher nur ansatzweise erklärt.

Eine umfassende Erklärung wäre eventuell möglich durch

1. Inkorporationszeiten bis zum Maximum der spezifischen Aktivität des Lezithins bei etwa 3 Stunden,
2. Bestimmung des Cholineinbaus in die verschiedenen Lezithinfraktionen,
3. ultrastrukturelle Untersuchungen mit Isolierung von Synaptosomen.

V ZUSAMMENFASSUNG

A) Äthernarkose und Muskelschnitt hatten keinen Einfluß auf die Konzentrationen und spezifischen Aktivitäten der untersuchten Substanzen.

B) Die Konzentrationen von Cholin im Blut, sowie von Cholin, PC, CDP-Cholin, Lezithin und GPC im M. gastrocnemius von unbehandelten Ratten wurden bestimmt. Der Einbau von markiertem Cholin in diese Verbindungen wurde in Zeitintervallen von 2 bis 30 Minuten untersucht.

Dabei wurden folgende Befunde erhoben:

1. Das Blutcholin hat einen sehr schnellen Umsatz; 20 Min. nach der Injektion wurden nur noch 1 % der Radioaktivität im Blut gefunden.
2. Zwischen Cholin und PC besteht eine Precursor-Successor Beziehung. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit von Cholin beträgt 9,8 nmol/g/min.
3. GPC war stets höher markiert als Lezithin. Das deutet auf das Vorhandensein von Lezithin-pools mit verschiedenen Umsatzgeschwindigkeiten hin.

C) 24 Stunden nach Denervierung des rechten Musculus gastrocnemius wurden Konzentrationen und spezifische Aktivitäten der o. a. Verbindungen im Blut, im denervierten sowie im kontralateralen innervierten Muskel untersucht.

Zwischen dem denervierten und dem innervierten Muskel fanden sich folgende Unterschiede:

Die Konzentration des Cholins im denervierten Muskel

stieg um 46 % und die des Lezithins fiel um 6 %, vermutlich durch gesteigerten Basenaustausch. Da die Durchblutung des denervierten Muskels gesteigert ist und auch seine Permeabilität erhöht ist, setzt sich die Konzentrationserhöhung des Cholins auf das Blut fort. Dort stieg der Cholingehalt um 30 %.

Die spezifische Aktivität des Cholins war im denervierten Muskel geringer als im innervierten. Diese Veränderung ist konzentrationsbedingt.

Die spezifische Aktivität des PC war im denervierten Muskel durch Verlangsamung der Phosphorylierung erniedrigt. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit betrug im denervierten Muskel 4,1 nmol/g/min und im innervierten Muskel 7,4 nmol/g/min. Als Erklärung für die Verlangsamung der Phosphorylierung kommt ATP-Mangel in Frage.

Die spezifischen Aktivitäten von CDP-Cholin, Lezithin und GPC waren im denervierten Muskel erniedrigt, da sich die geringe Markierung des PC auf die Folgeprodukte übertrug.

Die Geschwindigkeit des Einbaus von PC ins Lezithin von denervierten und innervierten Muskeln waren annähernd gleich. Jedoch liegt dem Einbau von Ch ins Lezithin von denervierten und kontralateralen innervierten Muskeln eine andere Kinetik zugrunde als bei Muskeln nicht operierter Kontrolltiere.

Während der ersten 15 Min. Inkorporationszeit ist bei operierten Tieren ein verlangsamter Einbau vorhanden. Von 15 - 30 Min. ist der Einbau verstärkt. Das könnte auf verschiedene Lezithinkompartimente mit unterschiedlichen Umsatzgeschwindigkeiten hindeuten.

Als Anzeichen einer beginnenden kompensatorischen Hyper-

trophie zeigten die innervierten Muskeln von operierten Tieren gegenüber Muskeln von nicht operierten Tieren einen erhöhten Cholin- und Lecithingehalt sowie eine verstärkte Markierung des Cholins und Lecithins.

Die Veränderungen der denervierten Muskeln sind vermutlich primär das Resultat einer beginnenden Degeneration der motorischen Endplatten, während die Veränderungen der innervierten Muskeln durch eine beginnende kompensatorische Hypertrophie vermutlich primär an den Muskelfasern stattfinden.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ARTOM, C. (1940)
 Phospholipid metabolism in denervated muscles
 J. Biol. Chem. 139 953 - 961

- 2 ARTOM, C., LOFLAND, H.B. (1960)
 Lecithin formation by methylation of intact
 phosphatidyl dimethylethanolamine
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 3 244 - 247

- 3 BASS, A. (1962)
 Energy metabolism in denervated muscle
 In: The denervated Muscle 203 - 273
 E: Gutmann, E.
 Czech. Acad. of Science Prag

- 4 BJERVE, K.S. (1973)
 The phospholipid substrates in the Ca^{2+} stimulated
 incorporation of nitrogen bases into microsomal
 phospholipids
 Biochim. Biophys. Acta 306 396 - 402

- 5 BJØRNSTAD, P., BREMER, J. (1966)
 In vivo studies on pathways for the biosynthesis
 of lecithin in the rat
 J. Lipid. Res. 7 38 - 45

- 6 BOGATZKI, M. (1952)
 Über das Verhalten der Membranpermeabilität des
 quergestreiften Muskels nach Denervierung
 Z. ges. exp. Med. 118 544 - 553

- 7 BREMER, J., FIGARD, P.H., GREENBERG, D.M. (1960)
The biosynthesis of choline and its relation to
phospholipid metabolism
Biochim. Biophys. Acta 43 477 - 488

- 8 CECCARELLI, B., HURLBURT, W.P., MAURO, A. (1973)
Turnover of transmitter and synaptic vesicles of
the frog neuromuscular junction
J. Cell. Biol. 57 499 - 524

- 9 DAWSON, R.M.C. (1955)
The role of GPC and GPE in liver phospholipid
metabolism
Biochem. J. 59 5 - 8

- 10 DAWSON, R.M.C. (1956)
Liver GPC-Diesterase
Biochem. J. 62 689 - 693

- 11 DAWSON, R.M.C. (1966)
The metabolism of animal phospholipids and their
turnover in all membranes
In: Essays in biochemistry 2 69 - 115
E: Campbell, P.N.
Acad. Press London-New York

- 12 DILS, R.R., HÜBSCHER, G. (1961)
Metabolism of phospholipids III: The effect of
calcium ions on the incorporation of labelled
choline into rat liver microsomes
Biochim. Biophys. Acta 46 505 - 513

- 13 DROSS, K., KEWITZ, H. (1972)
Concentration and origin of choline in the rat brain
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274 91 - 106

- 14 ERBLAND, J.F., MARINETTI, G.V. (1965)
The enzymatic acylation and hydrolysis of lysolecithin
Biochim. Biophys. Acta 106 128 - 138

- 15 FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. (1925)
The colorimetric determination of phosphorus
J. Biol. Chem. 66 375 - 400

- 16 FLICKINGER, Ch.J. (1975)
The relation between the Golgi apparatus, cell
surface and cytoplasmic vesicles in amoebae studied
by electron microscope radioautography
Exp. Cell. Res. 96 189 - 201

- 17 FRIEDLANDER, H.D., PERLMANN, I., CHAIKOFF, I.L. (1940)
The effects of denervation on phospholipid activity
of skeletal muscle as measured with radioactive
phosphorus
Am. J. Physiol. 132 24 - 31

- 18 GIBSON, K.D., WILSON, J.D., UDENFRIED, S. (1961)
The enzymatic conversion of phospholipid ethanolamine
to phospholipid choline in rat liver
J. Biol. Chem. 236 673 - 679

- 19 GOLDBERG, A.L., ETLINGER, J.D. (1975)
Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal
muscle
Medicine and Science in Sports Vol. 7 No. 3 185 - 198

- 20 GRAFF, G.L.A., HUDSON, A.J., STRICKLAND, K.P. (1965)
 Biochemical changes in denervated skeletal muscle
 III: The effect of denervation atrophy on the concentration and ^{32}P labelling of the individual phospholipids of the rat gastrocnemius
 Biochim. Biophys. Acta 104 543 - 553

- 21 GRUND, G. (1912)
 Zur chemischen Pathologie des Muskels I: Stickstoff- und Phosphorverteilung im entarteten Muskel
 Arch.exp. Path. u. Pharmakol. 67 393 - 407

- 22 GUTMANN, E., ZELENÁ, J. (1962)
 Morphological changes in the denervated muscle
 In: The denervated Muscle 57 - 102
 E: Gutmann, E.
 Czech. Acad. of Science Prag

- 23 HEUSER, J.E., REESE, T.S. (1973)
 Evidence for recycling of synaptic vesicles during transmitter release at the frog neuromuscular junction
 J. Cell. Biol. 57 315 - 344

- 24 HEUSER, J. (1976)
 Morphology of synaptic vesicles discharge and reformation at the frog neuromuscular junction
 In: Motor innervation of muscle 51 - 117
 E: Thesleff, S.
 Acad. Press London-New York

- 25 HIRANO, H., PARKHOUSE, B., NICOLSON, G.L. (1972)
Distribution of saccharide residues on membrane
fragments from a myeloma-cell homogenate: Its
implications for membrane biogenesis
Proc. Nat. Acad. Sci. 69 2945 - 2949
- 26 HOLUB, B.J., BRECKENRIDGE, W.C., KUKSIS, A. (1971)
Studies of differential turnover of palmitoyl and
stearoyl species of glycerophosphatides using
labelled unsaturated acids
Lipids 6 307 - 313
- 27 HUDLICKÁ, O., RENKIN, E.M. (1969)
Blood flow and blood-tissue diffusion of ^{86}Rb in
denervated and tenotomized muscles undergoing atrophy
Microvascular Res. 1 147 - 157
- 28 HUDLICKÁ, O. (1973)
Muscle blood flow
Swets u. Zeitlinger B.V. Amsterdam
- 29 HUMOLLER, F.L., GRISWOLD, B., McINTYRE, A.R. (1950)
Comparative chemical studies in skeletal muscle
following neurotomy and tenotomy
Am. J. Physiol. 161 406 - 412
- 30 HUMOLLER, F.L., HATCH, D., McINTYRE, A.R. (1952)
Effect of neurotomy on lipid content of striated
muscle
Am. J. Physiol. 169 654 - 658

- 31 HUMOLLER, F.L., HATCH, D., MCINTYRE, A.R. (1952)
Cytochrome oxidase activity in muscle following
neurotomy
Am. J. Physiol. 170 371 - 374
- 32 ILLINGWORTH, D.R., PORTMAN, O.W. (1972)
The uptake and metabolism of plasma lysophosphat-
idylcholine in vivo by the brain of squirrel monkeys
Biochem. J. 130 557 - 567
- 33 JABLECKI, C., DIENSTAG, J., KAUFMANN, S. (1977)
³H-inositol incorporation into phosphatidyl-inositol
in work-induced growth of rat muscle
Am. J. Physiol. 232(3) 324 - 329
- 34 JUNGAWALA, F.B., DAWSON, R.M.C. (1970)
Phospholipid synthesis and exchange in isolated
liver cells
Biochem. J. 117 481 - 490
- 35 KENNEDY, E.P., WEISS, S.B. (1956)
The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis
of phospholipids
J. Biol. Chem. 222 193 - 214
- 36 KEWITZ, H. (1959)
Nachweis von 4-Amino-n-butyrylcholin im Warmblüter-
gehirn
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 237
308 - 318

- 37 KEWITZ, H., DROSS, K., PLEUL, O. (1973)
Choline and its metabolic successors in brain
Central Nervous System - Studies on metabolic
regulation and function
E.: E. Genazzani u. H. Herken
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York

- 38 KLÖPPEL, A., POST, D., SCHNEIDER, G. (1970)
Abtrennung quarternärer Ammoniumverbindungen über
zerlegbare Ionenpaarextrakte mit nachfolgender
Identifizierung
Fresenius Ztschr. Analyt. Chem. 252 279 - 284

- 39 KRAUPP, O., BAUMGARTEN, G. (1962)
Abgabe von freiem Cholin aus der innervierten
und denervierten Skelettmuskulatur
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.
243 508 - 518

- 40 KUNZ, W. (1969)
Funktion der Mitochondrien
In: Molekulare Biologie der Zelle 503 - 545
E.: Bielka, H.
Fischer Verlag Stuttgart

- 41 LANDS, W.E.M. (1960)
Metabolism of glycerolipids II: The enzymatic
acylation of lysolecithin
J. Biol. Chem. 235 2233 - 2237

- 42 LAPETINA, E.G., LUNT, G.G., DeROBERTIS, E. (1969)
The turnover of phosphatidyl choline in rat cerebral
cortex membranes in vivo
J. Neurobiol. 1 295 - 302

- 43 LEVINE, R., HECHTER, O., SOSKIN, S. (1941)
Biochemical characteristics of denervates skeletal
muscle at rest and after direct stimulation
Am.J. Physiol. 132 336 - 345

- 44 LIBELIUS, R., LUNDQUIST, I., TEMPLETON, W. (1978)
Intracellular uptake and degradation of extra-
cellular tracers in mouse skeletal muscle in vitro:
The effect of denervation
Neuroscience 3 641 - 647

- 45 MASORE, E.J., ROWELL, L.B., McDONALD, R.M. (1964)
Skeletal muscle lipids I: Analytical method and
compositon of monkey gastrocnemius and soleus muscles
Biochim. Biophys. Acta 84 493 - 506

- 46 McCARTY, L.P., KNIGHT, A.S., CHENOWETH, M.B. (1973)
Incorporation of ¹⁴C-choline into phospholipids in
the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of
the rat
J. Neurochem. 20 487 - 494

- 47 McMURRAY, W.C., MAGEE, W.L. (1972)
Phospholipid metabolism
Ann. Rev. Biochem. 41 129 - 160

- 48 MORRÉ, D.J., Van Der WOUDE, W.J. (1974)
Origin and growth of cell surface components
In: Macromolecules regulating growth and development 81 - 111
E.: Hay, E.D.
Academic Press New York
- 49 MÜCK, R. (1975)
Inauguraldissertation Berlin
- 50 OLTHOFF, D., KUNZE, D., JAGE, J. (1976)
Untersuchungen der Membranphosphatide der Skelettmuskulatur nach der Einwirkung von Muskelrelaxantien
Rev. Roum. Med.-Neurol. Psychiat. 14 169 - 175
- 51 PARKER, F., PETERSON, N. (1965)
Quantitative analysis of phospholipids and phospholipid fatty acids from silica gel thin-layer chromatograms
J. Lipid. Res. 6 455 - 460
- 52 PELLEGRINO, C., FRANZINI, C. (1963)
An electron microscope study of denervation atrophy in red and white muscle fibers
J. Cell.Biol. 17 327 - 349
- 53 PENNINGTON, R.J., WORSFOLD, M. (1969)
Biosynthesis of lecithin by skeletal muscle
Biochim. Biophys.Acta 176 774 - 782

- 54 POTTER, L.T. (1970)
 Synthesis, storage and release of ^{14}C -acetylcholine
 in isolated rat diaphragm muscles
 J. Physiol. 206 145 - 166

- 55 REGER, J.F. (1959)
 Studies in the fine structure of normal and denerva-
 ted neuromuscular junctions from mouse gastrocnemii
 J. Ultrastruct. Res. 2 269 - 282

- 56 RESCIGNO, A., SEGRE, G. (1966)
 The precursor-successor relationship: Zilversmit's
 rule
 In: Drug and tracer kinetics S. 186ff
 Blaisdell Publ. Comp. Waltham-Toronto-London

- 57 RICHTER, G., ELLENBECK, J. (1899)
 Beiträge zur Kenntnis der Veränderungen des Muskels
 nach der Durchschneidung seines Nerven
 Arch. path. Anat. u. Physiol. 158 199 - 253

- 58 SALERNO, D.M., BEELER, D.A. (1973)
 The biosynthesis of phospholipids and their
 precursors in rat liver involving de novo methylation
 and baseexchange pathways, in vivo
 Biochim. Biophys. Acta 326 325 - 331

- 59 SCHILL, G., DANIELSSON, B. (1959)
 Photometric determination of quarternary ammonium
 compounds with hexanitrodiphenylamin I
 Analyt.Chem. Acta 21 248 - 254

- 60 SCHMIDT, C.G. (1952)
Das Verhalten der Cytochromoxidase im denervierten
atrophischen Muskel
Biochem. Zeitschr. 323 266 - 274
- 61 SCHÖN, R. (1969)
Lipide
In: Molekulare Biologie der Zelle 127 - 155
E.: Bielka, H. Stuttgart
- 62 SCHWARTZKOPFF, T. (1975)
Inauguraldissertation Berlin
- 63 SIEKEVITZ, P. (1972)
Biological membranes: The dynamics of their organi-
zation
Ann. Rev. Physiol. 34 117 - 140
- 64 SNYDER, F., STEPHENS, N. (1962)
Quantitative carbon-14 and tritium assay of thin-
layer chromatography plates
Anal. Biochem. 4 128 - 131
- 65 SNYDER, F. (1972)
Ether lipids - chemistry and biology
In: Progress in the chemistry of fats and other lipids
Vol. 10 P3 296 - 340
E.: Bergelson, L.D.

- 66 STAHL, E. (1967)
Dünnschichtchromatographie
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York
- 67 THOMPSON, G.A. (1973)
Phospholipid metabolism of animal tissue
In: Form and function of phospholipids 67 - 96
E.: Ansell, G.B.
Elsevier Scientific Publ. Comp. Amsterdam-London-New York
- 68 TREBLE, D.H., FRUMKIN, S., BALINT, J.A. (1970)
The entry of choline into lecithin, in vivo, by baseexchange
Biochim. Biophys. Acta 202 163 - 174
- 69 VARGA, E. KOSTYA, K., SZABO, E. (1950)
Phosphorylierung im denervierten Muskel
Arch. exp. Path. u. Pharmacol. 210 214 - 218
- 70 Von HUNGEN, K., MAHLER, H.R., MOORE, W.J., (1968)
Turnover of protein and ribonucleic acid in synaptic subcellular fraction from rat brain
J. Biol. Chem. 243 1415 - 1423
- 71 WEISS, S.B., WAGNER-SMITH, S., KENNEDY, E.P. (1958)
The enzymatic formation of lecithin from cytidine diphosphate choline and D-1,2 diglyceride
J. Biol. Chem. 231 53 - 64

- 72 WHITE, D.A. (1973)
The phospholipid composition of mammalian tissue
In: Form and function of phospholipids 441 - 480
E.: Ansell, G.B.
Elsevier Scientific Publ. Comp. Amsterdam-London-
New York
- 73 WILGRAM, G.F., KENNEDY, E.P. (1963)
Intracellular distribution of some enzymes catalysing
reaction in the biogenesis of complex lipids
J. Biol. Chem. 238 2615 - 2619
- 74 WIRTZ, K.W.A., ZILVERSMIT, D.B. (1968)
Exchange of phospholipids between liver mitochondria
and microsomes in vitro
J. Biol. Chem. 243 3569 - 3602
- 75 ZILVERSMIT, D.B., ENTENMAN, C. (1943)
On the calculation of "turnover time" and "turnover
rate" from experiments involving the use of labeling
agents
J. Gen. Physiol. 26 325 - 331

Herrn Prof. Dr. med. H. Kewitz danke ich
für die Überlassung des Themas und für
die wertvollen Anregungen bei der Abfas-
sung der Arbeit.

Herrn Dr. med. vet. O. Pleul und Herrn
Dr. med. Th. Schwartzkopff danke ich für
die Mitarbeit bei der Durchführung der
Tierversuche.

Frau H. Müller und Frau U. v. Grodzicki
danke ich für ihre Unterstützung bei der
Probenaufarbeitung.

LEBENS LAUF

Name	Udo Stemmer
geboren	5. Nov. 1950 in Wilhelmshaven
Ausbildungsgang	1957 - 1966 Volksschule in Wilhelmshaven 1966 - 1969 Lehre als Feinmechaniker beim Marine-Arsenal Wilhelmshaven 1969 - 1971 Berufsausbildung beim Marine-Arsenal Wilhelmshaven und an der Technischen Universität Berlin 1971 - 1974 Erwerb der Hochschulreife am Berlin-Kolleg 1974 - 1980 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin November 1980 Approbation als Arzt Seit 1981 Assistenzarzt an der Chir. Klinik I des St. Joseph Krankenhauses Berlin

